1re Année. — No 3. (Trimestriel). Juillet-Août-Septembre 1959

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE

ANNALES DE L'INSTITUT NATIONAL
DE LA
RECHERCHE AGRONOMIQUE

SÉRIE A bis

ANNALES DE PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE



INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

AVIS AUX LECTEURS

Des modifications importantes sont apportées pour l'année 1959 aux Annales de l'Institut National de la Recherche Agronomique, en vue de mieux adapter l'ensemble de ces publications aux besoins des lecteurs. D'une part, une série nouvelle vient d'être créée : la série A *bis*, consacrée à la Physiologie Végétale, qui paraîtra 4 fois par an. D'autre part, dans les autres séries, le nombre moyen de pages a été augmenté. Désormais, les Annales de l'Institut National de la Recherche Agronomique comprendront les séries suivantes :

Série A — **ANNALES AGRONOMIQUES.** — Agronomie générale et science du sol — couverture crème — 6 fascicules par an d'environ 120 pages.

Série A bis — **ANNALES DE PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE.** — Couverture bleue — 4 fascicules par an d'environ 50 pages.

Série B — **ANNALES DE L'AMÉLIORATION DES PLANTES.** — Couverture verte — 4 fascicules par an d'environ 120 pages.

Série C — **ANNALES DES ÉPIPHYTIES.** — Couverture rouge — 4 fascicules par an d'environ 120 pages.

Série C bis — **ANNALES DE L'ABEILLE.** — Couverture ocre — 4 fascicules par an d'environ 80 pages.

Série D — **ANNALES DE ZOOTECHNIE.** — Couverture jaune — 4 fascicules par an d'environ 80 pages.

Série E — **ANNALES DE TECHNOLOGIE AGRICOLE.** — Couverture grise — 4 fascicules par an d'environ 120 pages.

(Voir en page 3 de la couverture les conditions nouvelles d'abonnement).

Les commandes d'ouvrages doivent être adressées au Régisseur des publications. Adresse provisoire : Bâtiment provisoire du Palais de Chaillot, Aile Passy, Paris.

Règlement : par chèque bancaire à l'ordre du Régisseur des publications, par virement postal, à son compte courant : Paris 9064-43 ou par bons U. N. E. S. C. O.

PHOSPHORYLATION OXYDATIVE PAR LES MITOCHONDRIES DE FEUILLES ET DE RACINES. — 1. MITOCHONDRIES DE FEUILLES

PAR

G. DUCET, A. J. ROSENBERG et G. VANDEWALLE
Station centrale de Physiologie végétale, Versailles
et Institut de Biologie physico-chimique, Paris.

INTRODUCTION

Depuis le travail de MILLERD (1) montrant, avec les méthodes utilisées pour les tissus animaux, l'existence dans les tissus végétaux de fractions cellulaires possédant des propriétés analogues aux mitochondries (oxydation des acides du cycle de KREBS, couplée à une estérification du P min (Phosphorylation) de nombreuses recherches ont fourni des résultats analogues pour divers tissus végétaux.

SMILLIE (2), OHMURA (3), SISSAKYAN (4), ont montré l'existence dans les feuilles de fractions contenant des chloroplastes et possédant des activités de mitochondries. Récemment JAMES (5) a indiqué une séparation, par centrifugation en gradient de densité, des chloroplastes et des mitochondries de feuilles de Fève.

Nos recherches sur la respiration des végétaux (6) nous ont amené à l'étude des mitochondries de feuilles où l'action de l'oxyde de carbone indique la présence de cytochrome-oxydase. Dans les tissus animaux cette enzyme est toujours localisée dans les mitochondries. Nous avons étudié la phosphorylation oxydative sur des fractions cellulaires de feuilles. Par modification des conditions de préparation, nous avons pu mettre en évidence une activité oxydative et phosphorylante de la fraction mitochondriale préparée à partir des feuilles de Tabac.

En reprenant les techniques de JAMES, il ne nous a pas été possible de séparer les mitochondries des chloroplastes. Il semble que JAMES ait, en fait, seulement séparé les microsomes, et non les mitochondries, des chloroplastes.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les préparations ont été faites à partir de feuilles de Pois, Tomate, Tabac, Epinard et Betterave de développement variable, cultivés sur sol ou sur sable (avec solutions nutritives).

Les feuilles, après prélèvement, sont refroidies dans de l'eau glacée, puis broyées dans un mortier refroidi à 0°C, sans addition de sable, en présence d'une solution de saccharose 0,5 M, contenant du versène 0,005 M. Au cours du broyage, qui ne dure que quelques minutes le pH est maintenu à 7,0 par addition de NaOH N. Le broyat, filtré sur double étamine, est réparti dans des tubes de centrifugeuse.

Une première centrifugation à 3 000 TM pendant 7 min. (SPINCO Bol 30) élimine débris cellulaires, amidon et une partie des chloroplastes. Le liquide surnageant est centrifugé à 13 000 TM pendant 10 min dans le même bol. Le culot, renfermant chloroplastes et mitochondries, est remis en suspension dans la solution de broyage à l'aide d'un homogénéiseur de POTTER, manœuvré à la main, puis centrifugé de nouveau 10 m min. à 15 000 TM (SPINCO Bol 40). Le culot obtenu est dispersé dans un volume connu de saccharose 0,5 M.

Toutes les manipulations sont conduites de façon que la température des suspensions ne dépasse jamais 4°C.

ESSAIS

L'absorption d'oxygène est mesurée soit avec l'appareil de WARBURG à 20°C, soit par polarographie à l'aide d'un dispositif que nous décrirons ailleurs.

La phosphorylation est évaluée en suivant la disparition de P min ou la formation de P org selon des techniques que nous avons déjà décrites (7).

Pendant leur remplissage, les fioles sont maintenues à 0°C. Les divers réactifs sont mélangés à l'avance et introduits dans les fioles en une seule fois, sauf hexokinase, ATP et substrats qui sont apportés séparément. De cette manière, les erreurs dues aux nombreux pipetages sont réduites et dans ces conditions les valeurs du P min initial ne diffèrent pas de plus de 2 à 3 p. 100 entre des fioles identiques.

L'activité ATP asique est mesurée par la libération de P min entre une première détermination faite après mélange des divers réactifs, et une seconde mesure après un temps déterminé à 20°C.

Les réactions sont arrêtées par addition de 0,1 ml de ClO_4H conc. dans chaque fiole préalablement placée dans la glace. Après agitation le contenu est transvasé sans lavage dans des tubes de centrifugeuses

refroidis. La centrifugation est faite après 30 min de séjour à 0°C; les dosages sont effectués sur une partie aliquote du centrifugat.

Les solutions de saccharose sont préparées à partir de sucre cristallisé, passées sur colonne de Dowex 50 de manière à éliminer les traces de calcium et ensuite neutralisées à pH 7,0 avec la soude.

Nous utilisons l'eau bidistillée dans le verre ou déminéralisée sur colonne de résines.

RÉSULTATS

A. — Fractions mitochondriales de pois

1° *Influence du Fluorure.*

Dans nos premiers essais, chaque fiole contenait du fluorure 0,03 M afin d'inhiber l'ATPase et les autres phosphatases qui peuvent masquer la phosphorylation oxydative. Nous avons alors observé que l'oxydation du succinate diminuait très rapidement pour devenir nulle 20 à 40 min après avoir mis les fioles dans le thermostat.

Nous avons alors étudié l'influence du fluorure sur l'oxydation du succinate. La fig. 1 montre l'allure de l'absorption d'oxygène par des mitochondries de plantules de Pois, en présence de trois concentrations de fluorure. Le temps est compté dès la mise des fioles au thermostat. L'oxydation du succinate en 30 min est la même pour des concentrations de fluorure nulle ou 0,01 M, elle diminue considérablement avec FNa, 0,03 M.Le P min estérifié est maximum en présence de FNa 0,01 M, mais le P/O avec FNa 0,03 M est probablement supérieur à celui obtenu avec FNa 0,01 M et ce dernier supérieur à celui observé en l'absence de fluorure. Les préparations de mitochondries ont une activité phosphatasique que le fluorure inhibe partiellement : depuis ces essais, nous avons utilisé le fluorure à la concentration 0,01 M.

2° *Influence du temps.*

Un essai avec des mitochondries de plantules a montré la diminution de la vitesse d'absorption d'oxygène et de la phosphorylation avec le temps (Tabl. 1)

Dans ces essais nous avons observé que la phosphorylation commençait avant que l'hexokinase soit introduite dans le compartiment central de la fiole, ce qui amenait à trouver pour l'oxydation du succinate un P/O parfois supérieur à 2.

D'autre part le P min estérifié est calculé par différence entre le P min de la fiole sans succinate et celui de la fiole contenant ce substrat. Comme dans la première fiole il peut y avoir libération de P min par action des phosphatases sur les adénosine-phosphates apportés, cela tend à augmenter la valeur du P min incorporé dans la fraction P org.

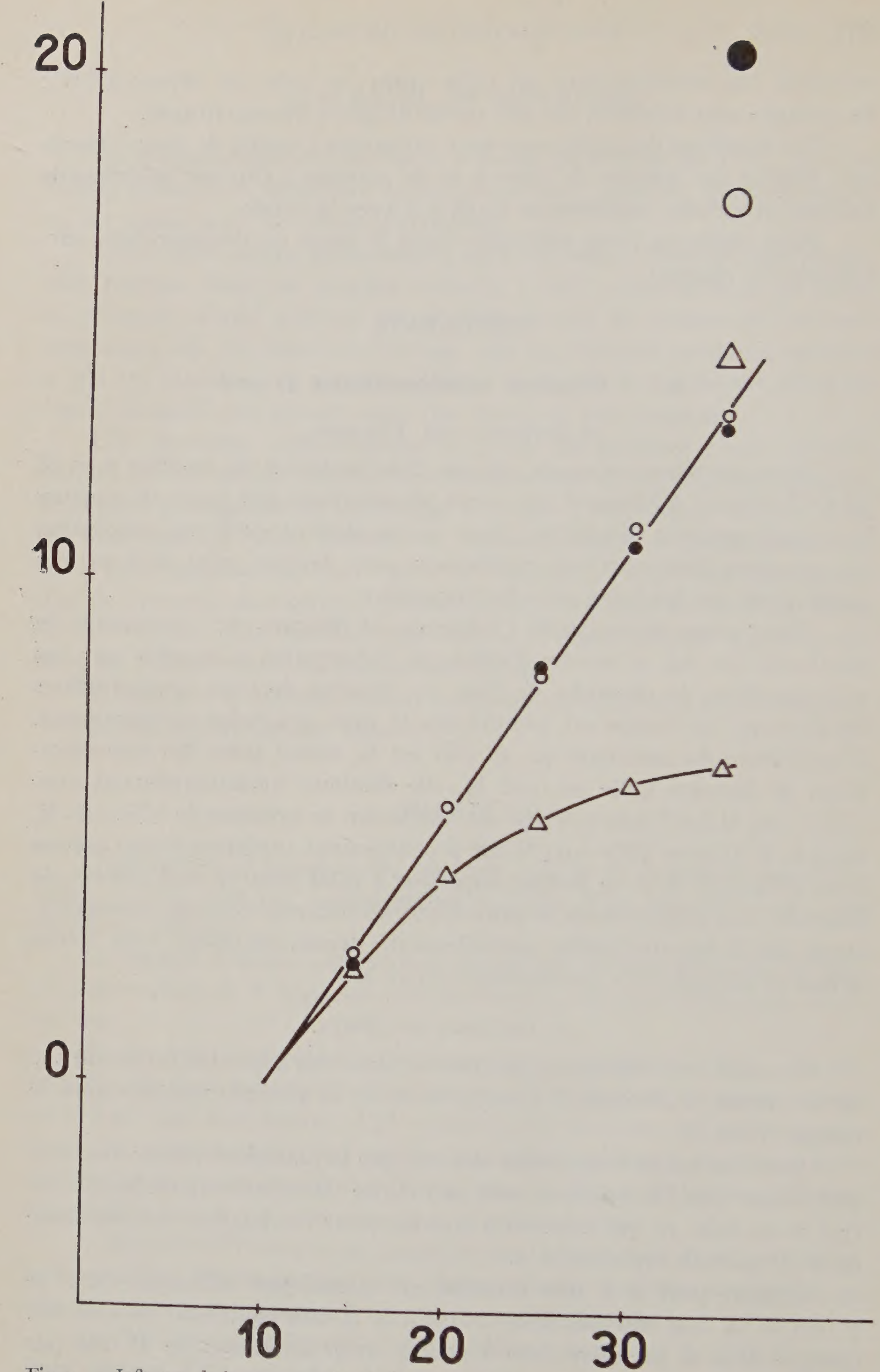


Fig. 1. — Influence de la concentration de fluorure sur l'absorption d'oxygène et la phosphorylation. Abscisse : temps en min. Ordonnée : à partir du O µA de O_2 absorbés et µA de P estérifiés. Oxygène : o sans fluorure ; • fluorure 0,01M ; Δ fluorure 0,03M. Phosphore : ○ sans fluorure ; ● fluorure 0,01M ; △ fluorure 0,03M.

Composition des fioles comme pour le tableau I, sauf pour le fluorure.

C'est pourquoi nous mesurons maintenant l'oxydation et la phosphorylation par comparaison des valeurs obtenues à l'aide de deux fioles de même composition. L'une, arrêtée 10 à 15 min après le transfert des fioles au thermostat, donne les valeurs au temps « zéro ». L'autre arrêtée après un temps variable permet de calculer l'oxygène absorbé et le phosphore estérifié.

TABLEAU I

Oxydation du succinate et phosphorylation, en fonction du temps.

Exp. 25-11-7
190 γN p. fiole

Temps en min.	µAt O_2	µM P
—	—	—
20	5,2	8,8
40	—	13,8
60	10,8	16,5

Composition des fioles : FNa 30 µM, Cl_2Mg 20 µM, Tris pH 7,4 40 µM, PO_4 pH 7,4 30 µM, Saccharose 400 µM, ATP 5 µM, Succinate 100 µM. Dans le diverticule latéral : Hexokinase 0,5 mg, Glucose 50 µM, Mitochondries 0,5 ml.
Volume total 3 ml ; 0,2 ml NaOH 10 p. 100 dans le diverticule central.

Le tableau II donne quelques résultats de mesures faites selon cette nouvelle technique. L'expérience 2, pour laquelle le P/O mesuré est 1,43, aurait donné une valeur supérieure à 2 si l'on avait comparé les résultats obtenus avec et sans succinate (10,2 + 6,1/7,15).

TABLEAU II

Mesure de la phosphorylation oxydative par comparaison.

	µAt O_2	µM P	P/O
	—	—	—
Exp. 1 10-12-7			
300 γ N p. fiole			
40 mn. -10 mn.			
avec succinate	— 3,7	— 5,5	1,48
	— 3,55	— 5,5	1,55
sans succinate	+ 0,3	+ 3,0	
	+ 0,4	+ 2,5	
Exp. 2 12-12-7			
300 γ N p. fiole			
50 mn. -10 mn.			
avec succinate	— 7,15	— 10,2	1,43
sans succinate	0	+ 6,1	
Exp. 3 12-12-7			
300 γ N p. fiole			
50 mn. -15 mn.			
avec α cetoglutarate	— 3,71	— 8,7	2,34

Composition des fioles comme pour le tableau I. L'hexokinase et le glucose sont introduits dans le compartiment central avec les autres réactifs. Ce système est toujours utilisé par la suite.

Comme dans le cas des mitochondries animales, l'absorption d'oxygène en l'absence de substrat est nulle pour nos préparations, contrairement aux résultats obtenus par PIERPOINT (8) qui observe une oxydation endogène assez considérable. Chaque fois que nous constatons cette oxy-

dation endogène, la phosphorylation est nulle ou très faible, indice d'une dégradation des mitochondries.

3° *Autres facteurs.*

Nous avons vérifié l'influence de l'hexokinase et l'action du 2-4 Dinitrophénol (DNP) sur l'oxydation et la phosphorylation. Les résultats (tableaux III et IV) indiquent qu'une fraction de la phosphorylation liée à l'oxydation de l'α cétoglutarate est insensible au DNP (P/O > 0,8) alors que la phosphorylation qui accompagne l'oxydation du succinate est complètement inhibée par le DNP 10^{-4} M.

TABLEAU III

Influence de l'hexokinase et du DNP sur la phosphorylation (feuilles de Pois) μM de P estérifié. Valeur du P/O entre parenthèse.

	Complet	Hexokinase	DNP 10^{-5}M	DNP $3\ 10^{-5}$M	DNP $5\ 10^{-5}$M	DNP 10^{-4}M
Exp. 1 3-12-7 620 γ N p. fiole 27 mn. avec succinate.....	14,7	8,2	11,2	7,5	4,4	0
Exp. 2 13-12-7 275 γ N p. fiole 50 mn. avec succinate.....	7,2 (1,55)		5,2 (0,95)		2,3 (0,44)	
Exp. 3 16-12-7 325 γ N p. fiole 40 mn. avec succinate.....	12,6					
avec α cetoglutarate........	9,15 (2,20)		7,8 (1,65)		3,0 (0,80)	2,3 (0,81)

TABLEAU IV

Influence du fluorure et de l'hexokinase sur l'oxydation et la phosphorylation (feuilles de Pois).

Exp. 31-12-7 600 γ N p. fiole 30 mn. avec succinate	Complet	— fluorure	— fluorure — hexokinase
μAt O_2	3,55	5,6	5,7
μM P	5,3	5,2	0
P/O	1,49	0,95	0

En l'absence de fluorure l'oxydation est favorisée mais le P/O diminue, ce que nous avions déjà observé. En l'absence du fluorure et d'hexokinase la phosphorylation est nulle malgré que l'oxydation soit la même qu'en la seule absence de fluorure.

Le DNP ne stimule à aucun moment l'absorption d'oxygène malgré la phosphorylation partiellement inhibée. Comme l'a indiqué LATIES (9), dans les conditions optimum d'oxydation qui correspondent à un niveau

élevé d'accepteurs de P min, le DNP ne stimule pas l'absorption d'oxygène. Nous observons souvent une inhibition, même pour une concentration de 10^{-5} M.

B. — **Fractions mitochondriales d'autres feuilles.**

Le broyage de feuilles de Tomate, Epinard, Tabac dans la solution utilisée pour préparer les mitochondries de Pois (saccharose 0,5 M, Versène 0,005 M) n'a donné que des préparations inactives. Ces feuilles semblent même contenir des substances inhibitrices : par broyage d'un mélange de feuilles de Pois et de Tomate, les mitochondries obtenues ont une activité oxydative réduite par rapport à celle du Pois et la phosphorylation est totalement inhibée (tableau V). L'oxydation endogène, nulle pour

TABLEAU V

Inhibition de l'oxydation et de la phosphorylation.

Exp ; 24-1-8		
Poids de feuilles	10 g Pois	10g Pois + 7,8 g Tomate
N p. fiole	220 γ	400 γ
μAt O_2 en 20mn.		
sans succinate	0	0,77
avec succinate	5,1	3,15
μM P en 20 mn.	5,5	0

les mitochondries de Pois, est notable pour les mitochondries provenant du mélange Pois, Tomate. Un essai analogue a été fait avec les feuilles de Pois et Tabac (tableau VI). La phosphorylation est moins inhibée que

TABLEAU VI

Inhibition de l'oxydation et de la phosphorylation (avec le succinate).

Exp. 19-2-8			
Feuille	Pois	Tabac	Pois + Tabac
N p. fiole..	460 γ	470 γ	700 γ
μAt O_2 en 20 mn ..	3,96	1,12	4,34
μM P en 20 mn....	4,0	0,4	3,3
ATPase 20 mn à 20°C			
μM P libéré.	1,62	1,52	1,90

dans l'essai du tableau V. L'activité ATP-asique est sensiblement la même pour les préparations de Pois et de Tabac alors que la phosphorylation est très différente. La faible phosphorylation observée avec le Tabac n'est donc pas due à une activité ATP asique accrue, comme nous l'avons remarqué pour les mitochondries de racines d'orge (10). Aussi avons nous cherché une amélioration des activités oxydative et phosphorylante en modifiant les conditions de préparation des mitochondries.

Infiltration sous vide.

L'infiltration sous vide de la solution de broyage, en remplissant de liquide les espaces intercellulaires, a déjà amélioré les préparations. L'utilisation de versène plus concentré (0,05 M), qui nous avait donné de bons résultats avec les racines d'orge, dans la solution d'infiltration a permis pour le Tabac de préparer des mitochondries actives, comme le montrent les tableaux VII et VIII. Les QO_2 varient de 100 à 275 (µl de O_2 par mg d'azote de mitochondrie et par heure).

TABLEAU VII

Infiltration sous vide en présence de versène 0,05 M (feuille de Tabac).

	µAt O_2	µM P	P/O	ATPase (25 mn. 20°C) µM P
Exp. 1. 28-2-8				
600 γ N p. fiole 20 mn.				
sans succinate	0,4			
avec succinate	2,2	2,6	1,15	1,75
Exp. 2. 18-3-8				
380 γ N p. fiole 20 mn.				
avec succinate	1,1	1,5	1,35	1,25
Exp. 3. 19-3-8				
400 γ N p. fiole 20 mn.				
avec succinate	3,28	4,28	1,30	

TABLEAU VIII

Influence du milieu de broyage sur l'activité des mitochondries (Tabac)

Exp. 3-3-8		
Milieu de broyage	Saccharose 0,5M Versène 0,005M	Saccharose 0,5M Versène 0,05M
500 γ N p. fiole 20 mn.		
sans succinate :		
µAt O_2	0	0
avec succinate :		
µAt O_2	0	2,3
µM P	+ 0,7	3,85
P/O	0	1,67

La même solution de broyage a permis [illegible] tenir avec de très jeunes tomates (première feuille étalée — 430 γ N p. fiole) une phosphorylation de 1,79 µM P en 20 mn et un P/O de 1,4 (Exp. 11-3-8). La feuille d'Epinard a donné pour 725 γ N p. fiole, en 20 min., 3,76 µAt O_2 et 4,0 µM P.

Par contre les feuilles adultes de Tomate, Vigne, Betterave donnent des préparations dont la phosphorylation est nulle, avec une oxydation endogène importante et une capacité d'oxydation du succinate qui diminuent très rapidement avec le temps. L'oxydation du succinate est légèrement supérieure à celle observée en l'absence de ce substrat.

Mesure de la Phosphorylation à l'aide du ^{32}P

Les préparations de fractions mitochondriales de feuilles ont souvent des activités faibles et nous avons utilisé ^{32}P pour mesurer d'une manière plus exacte l'incorporation du P min ; en effet, par dosage chimique, le P min estérifié est dosé par différence, ce qui donne de grandes erreurs si les différences sont faibles. Par mesure de radioactivité nous pouvons mesurer la formation du P org. grâce à une extraction sélective du P min. Dans ces conditions, de faibles quantités de phosphore estérifié peuvent être mesurées, même en présence de grandes quantités de P min.

TABLEAU IX

Comparaison de la méthode chimique et de la méthode par radioactivité pour la mesure de la phosphorylation.

Exp. 26-3-8	Dosage chimique	Dosage par radioactivité
Précision	2 p. 100	50 c. p. mn.
Initial	11,0 µMP	21 000 c. p. mn. = 1920 c. p. mn. par µMP mn.
sans succinate	10,9	100 (Porg.)
avec succinate		
10 mn.	10,7	800 = 0,41 µMP
30 min.	9,9	21 000 = 1,09 µMP
30-10 mn.	0,8 ± 0,4	0,68 ± 0,05

Un exemple de résultats obtenus par les deux méthodes est indiqué dans le tableau IX. La précision de la méthode au ^{32}P permet de différencier de très faibles incorporations, en particulier le P min estérifié pendant la période d'équilibration thermique. Cette méthode a été utilisée pour les expériences que nous allons présenter.

C. — Variations de l'activité avec l'âge et l'état physiologique de la feuille

Les résultats du tableau X montrent la différence d'activité des fractions mitochondriales de feuilles jeunes et adultes, prélevées sur les mêmes Tabacs. La phosphorylation est régulière pendant 30 min pour les jeunes feuilles, tandis que pour les adultes, quoiqu'importante pendant les 10 premières minutes, elle diminue considérablement entre la dixième et la trentième minute. Nous ne pouvons connaître l'absorption d'oxygène pendant les 10 premières minutes (période d'équilibration thermique), cependant il est certain qu'elle est supérieure, pour les feuilles adultes, a celle observée ensuite. Malgré l'amélioration de nos conditions de préparation, les mitochondries de feuilles adultes restent assez instables.

Cette activité variable a été également observée par OHMURA SISSAKIAN et PIERPOINT. Nous pouvons dire que quand l'oxydation endo-

gène est nulle, la phosphorylation en présence de succinate est bonne, correspondant à un P/O supérieur à 1. Si la respiration endogène est notable, le P/O est ou faible ou nul. La phosphorylation est alors toujours nettement supérieure pendant l'équilibration thermique à celle que l'on observe ensuite.

TABLEAU X

Variation de l'activité avec l'âge de la feuille (Tabac).

Exp. 10-4-8	µAt O_2	µMP	P/O
Jeunes feuilles			
380 γ N p. fiole			
10 mn.		2,0	
30 mn.		5,7	
30-10 mn.	2,28	3,7	1,63
Feuilles adultes			
430 γ N p. fiole			
10 mn.		1,15	
30 mn.		1,7	
30-10 mn.	0,62	0,55	0,89

Nous avons fait quelques mesures avec des feuilles de Tabac carencé en potassium. Malgré une faible activité oxydative des mitochondries avec le succinate, la phosphorylation semble égale sinon légèrement supérieure à celle observée pour les feuilles du Tabac normal.

TABLEAU XI

Influence du lavage des feuilles par CO_3HK sur la phosphorylation oxydative (Tabac).

	µAt O_2	µMP	P/O
Exp. 1 19-5-8			
Feuilles adultes			
Lavage eau			
avec succinate: 30 mn	0	0	0
Lavage CO_3HK 0,5M 1 heure.			
avec succinate: 10 mn		0,65	
30 mn		1,05	
30-10 mn	0,7	0,4	0,6
Exp. 2 18-6-8			
Feuilles jeunes			
Lavage eau 1 heure,			
avec succinate 10 mn		2,15	
30 mn		5,5	
30-10 mn	2,5	3,35	1,42
Lavage CO_3HK 1 heure			
avec succinate 10 mn		1,19	
30 mn		1,23	
30-10 mn	1,22	0,04	0

Après lavage, les feuilles sont broyées par les procédés décrits.

Les feuilles adultes de Tabac, sur pieds à un stade proche de la floraison, donnent souvent des fractions inactives. Ces feuilles sont généralement recouvertes d'un enduit poisseux et nous avons pensé qu'au cours du broyage cet enduit pouvait enrober les mitochondries et les inactiver.

Par lavage des feuilles avec une solution de CO_3K_2 0,5 M ou mieux de CO_3KH 0,5 M, il est possible d'éliminer en partie l'enduit poisseux et d'obtenir des mitochondries actives. Leur activité diminue toutefois assez rapidement. Le lavage avec CO_3HK a été répété plusieurs fois sur divers lots de feuilles de Tabac : il a chaque fois permis de préparer des fractions actives. Par contre la même technique appliquée aux feuilles adultes de Tomate n'a pas donné de fractions actives.

Le lavage avec CO_3HK est parfois nuisible : de jeunes feuilles de Tabac, non poisseuses, lavées avec cette solution donnent des mitochondries moins actives que celles obtenues après lavage des feuilles à l'eau distillée. Dans le cas de jeunes feuilles du bouquet terminal, légèrement poisseuses, le lavage avec CO_3HK a donné des résultats meilleurs que le lavage à l'eau. Le tableau XI résume quelques uns de nos résultats.

A l'aide de certains artifices, il est donc possible de mettre en évidence une activité oxydative dans les fractions cellulaires de feuilles. Cette activité, liée à une phosphorylation, est souvent de courte durée aussi est-il difficile d'apprécier ce qu'elle représente dans la respiration de la feuille entière. Une extrapolation grossière indique que cette activité correspond aux valeurs du QO_2 : la respiration des feuilles pourrait être complètement contrôlée par l'activité des mitochondries.

DISCUSSION

Divers milieux de broyage ont été proposés pour l'obtention de mitochondries actives chez les végétaux.

Mc Clendon avait montré l'intérêt de polyglycols du type Carbowax pour la préparation des chloroplastes de divers végétaux. Nous avons essayé ces corps (1) mais ils ne nous ont pas permis d'obtenir des préparations actives : l'oxydation endogène était toujours très forte. Ceci s'explique d'ailleurs par la précipitation du liquide cytoplasmique (L. C.) par le Carbowax (Clendenning (11) : les particules cellulaires sont alors enrobées de L. C. et l'oxydation peut être catalysée par divers systèmes oxydatifs ou substrats présents dans ce liquide. Les recherches de Clendenning portaient sur l'influence des saponines, de l'acidité vacuolaire, des tannins et de la pression osmotique sur la réaction de Hill.

Nos échecs, pour préparer des fractions actives, à partir de feuilles de Bette, Vigne, Tomate adulte, tiennent sans doute à des influences analogues sur l'activité des mitochondries. Le tableau V montre, par exemple, l'action inhibitrice sur l'oxydation du succinate provoquée par le broyage simultané de feuilles de pois et de tomates. Par rapport aux

(1) Nous tenons à remercier la firme NAPHTACHIMIE pour la fourniture gracieuse de divers échantillons de ces produits.

mitochondries de pois, les mitochondries obtenues présentent une activité oxydative réduite et une activité phosphorylante nulle.

Nous avons obtenu des résultats analogues pour les mitochondries de racines. Mais alors que la faible activité phosphorylante des mitochondries de racines est liée à une activité ATP-asique élevée, nous n'avons rien observé de semblable pour les mitochondries de feuilles : l'activité ATP asique est sensiblement la même pour les mitochondries de Pois qui phosphorylent assez bien, pour celles de Tabac qui phosphorylent très peu et pour celles provenant du broyage de Pois et Tabac, dont l'activité phosphorylante est intermédiaire entre les deux autres (tableau VI).

Les premiers essais, utilisant le broyage des feuilles de Tabac dans une solution de saccharose, sans infiltration, nous ont donné des fractions souvent inactives. Ce n'est que par infiltration sous vide et utilisation de versène à forte concentration (M/20), que nous avons obtenu une activité oxydative et phosphorylante notable. Cette technique nous a été suggérée par un travail de GINZBURG (12) qui utilise du versène 0,1 M pour isoler les cellules de racines de pois. Le versène peut agir comme complexant de métaux lourds. Nous avons en effet observé que le liquide cytoplasmique obtenu après centrifugation de la fraction mitochondriale était beaucoup moins coloré en brun quand les feuilles étaient broyées en présence de versène 0,05 M qu'en présence de versène 0,005 M.

Pour les feuilles de tabac, nous avons obtenu un QO_2 minimum (µl O2 par mg N et par heure) de 49 (P O,0,9) (exp. 10-4-8 du tableau IX) pour les feuilles adultes et maximum de 275 (P O 1,3) (exp. 19-38-8 du tableau VII) pour les jeunes feuilles, QO_2 comparables à ceux obtenus par PIERPOINT. Les préparations de PIERPOINT présentent toutefois une oxydation endogène assez importance alors que nos préparations n'en ont pratiquement pas, en particulier quand la phosphorylation oxydative est élevée.

De plus, notre milieu d'extraction contient seulement du saccharose et du versène sans aucune autre addition, en particulier d'acides organique. OHMURA avait introduit l'utilisation de citrate, puis, ultérieurement, d'acide ascorbique, dans les milieux de broyage. PIERPOINT a essayé divers acides organiques et trouvé que l'absence de citrate ou de succinate tend à augmenter l'oxydation endogène et à diminuer l'oxydation du succinate.

De même, cet auteur ajoute divers cofacteurs à ses milieux réactionnels, et en particulier du cytochrome C. Avec ce transporteur, l'activité succinoxydasique varie de 100 (sans cytochrome C) à 280 avec 2, $4 \cdot 10^{-6}$ M cytochrome C. Nous avions vérifié pour des mitochondries de plantules étiolées que l'addition de cytochrome C n'augmente ni l'oxydation du succinate, ni la phosphorylation. Les mitochondries de tabac obtenues par PIERPOINT doivent dont être assez considérablement modifiées durant la préparation.

Nos résultats montrent qu'il n'est pas nécessaire d'apporter ces cofacteurs. La forte teneur en versène du milieu d'extraction ne modifie pas l'activité oxydative et phosphorylante des mitochondries de pois étiolés et nous supposons qu'il en est de même pour les mitochondries de feuilles.

La variabilité des activités obtenues, en particulier pour les mitochondries de tabac, ne permet pas de calculer avec certitude l'importance du rôle des oxydations mitochondriales dans la respiration. D'autres expériences faites sur les feuilles intactes nous permettent cependant de penser que les mitochondries sont le principal, sinon le seul agent de la respiration.

Nous avons utilisé récemment la tehnique des gradients de densité pour fractionner le contenu cellulaire. JAMES indique avoir séparé de cette manière, chloroplastes et mitochondries des feuilles de fève. Nos résultats, assez différents, seront publiés prochainement. Nous avions trouvé qu'il est possible de séparer sur un homogénat de plantules étiolées 6 types de particules de densité égale ou supérieure à 1,12. Pour l'homogénat de feuilles vertes, nous trouvons 4 ou 5 types et la fraction mitochondries-chloroplastes n'est pratiquement pas séparée quoiqu'il soit possible de repérer une couche légèrement plus dense que certains chloroplastes et présentant parfois un spectre contenant une bande d'absorption semblable à celle d'un cytochrome de type a. En fractionnant de nouveau cette couche sur un gradient de densité plus serrée (1,15 à 1,21), nous avons pu montrer qu'une fraction colorable spécifiquement par le vert janus se sépare pour une densité de 1,18, des plastes contaminants.

RÉSUMÉ

Il est possible de séparer des feuilles, par broyage et centrifugation fractionnée, une fraction dont les activités pour l'oxydation et l'incorporation du phosphore minéral sont analogues à celles observées avec les mitochondries des tissus animaux.

Cette fraction, pour le Tabac, la Tomate, etc., n'a aucune activité lorsque le milieu de broyage contient du versène 0,005 M. En combinant l'infiltration sous vide et une augmentation de la concentration en versène, la fraction présente une activité importante. Pour les feuilles adultes de Tabac, il est nécessaire d'éliminer des substances poisseuses qui recouvrent la feuille, avant de pouvoir obtenir une activité. Il est encore nécessaire d'étudier les conditions de préparation des mitochondries pour éviter la décroissance rapide d'activité que nous avons observée.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) MILLERD (A.), BONNER (J.), AXELROD (B.) et BANDURSKI (R.). — *Proc. Nat. Acad. Sc. U. S.* **37,** 355, 1951.
(2) SMILLIE (R. M.). — *Austr. J. Biol. Sc.*, **8,** 186, 1955 ; **9,** 339, 1956 ; **9,** 347, 1956 ; **9,** 81, 1956.
(3) OHMURA (T.). — *Nature,* **176,** 467, 1955.
(4) SISSAKYAN (N. M.). — *Advances in Enzymology,* **20,** 201, 1958.
(5) JAMES (W. O.) et DAS (V. R. S.). — *New Phytol.,* **56,** 325, 1957.
(6) DUCET (G.) et ROSENBERG (A. J.). — *Biokimya,* **22,** 409, 1957.
(7) DUCET (G.) et VANDEWALE (G.). — *Ann. Agro. Physiol. Veg.,* 1959, (sous presse).
(8) PIERPOINT (W. S.). — *Biochem. J.,* **71,** 518, 1959.
(9) LATIES (G. G.). — *Survey Biol. Progr.,* III, *Acad. Press* New York, 1957.
(10) DUCET (G.) VANDEWALE (G.) et SHEALTIEL (M.). — C. R., **256,** 1585, 1958.
(11) CLENDENNING (K. A.). — *Ann. Rev. Plant Physiol.,* **8,** 137, 1957.
(12) GINZBURG (B. Z.). — *Nature,* **181,** 398, 1958.

ÉTUDE COMPARATIVE DES ACIDES ORGANIQUES DES FEUILLES DE MAÏS VERT NORMAL ET DE MAÏS ALBINOS

PAR

P. LE ROUX

Station centrale de Physiologie végétale, Versailles

Nous avons séparé et dosé les acides organiques dans les feuilles d'un maïs vert normal et d'un mutant albinos.

Le prélèvement a été effectué au stade 3-4 feuilles. A ce stade le maïs blanc, qui est un mutant léthal du fait de l'absence de pigments assimilateurs, est encore turgescent.

1. — Technique.

Nous avons utilisé la méthode de fixation et d'extraction décrite par L. Roux et Mme C. Lesaint (1).

— Arrêt de l'activité enzymatique au moyen de l'éthanol à 80°, bouillant.

— Extraction à froid, au moyen de l'éthanol à 60°, du matériel végétal finement divisé dans un broyeur Servall (1 minute à 14 000 t/mn).

— Deuxième extraction, dans l'eau additionnée de résine cationique Dowex 50, du résidu d'extraction alcoolique.

Les jus d'extraction alcoolique et aqueuse sont purifiés par passage sur des colonnes échangeuses d'ions (Permutite 50 et Amberlite I. R. A. 400). On se débarrasse ainsi des acides aminés et des sucres.

Les acides organiques, retenus sur Amberlite I. R. A. 400, sont élués au carbonate d'ammonium. La séparation des acides organiques est réalisée par chromatographie de partage sur colonne de gel de silice selon la technique décrite par Isherwood (2) et modifiée par Bove et Raveux (3): l'élution se fait par paliers en augmentant graduellement la concentration du solvant (butanol tertiaire) dans le mélange éluant.

Les acides sont identifiés sur papier par cochromatographie unidimensionnelle avec des acides témoins :

— solvant : butanol — acide formique — eau (10-2-15)

— révélateur : vert de bromocrésol.

II. — Résultats :

L'acidité totale (acides libres — acides salifiés) est déterminée par titration potentiométrique.

Il nous a paru plus logique de rapporter l'acidité totale à la matière fraîche, car nous avons travaillé sur un maïs vert normal et un maïs non chlorophyllien.

L'acidité totale des feuilles de maïs vert (21,1 milliéquivalents pour 100 g de matière fraîche) est sensiblement équivalente à celle du maïs albinos (18,2 meq/100 g de matière fraîche).

Nous avons mis en évidence un certain nombre d'acides classiques du cycle de Krebs (acides fumarique, succinique, aconitique, malique et citrique). Les acides cétoniques (pyruvique, αcétoglutarique, oxalacétique), particulièrement labiles du fait de la contiguité des groupements carbonyle et carboxyle, ne sont pas décelés car la méthode de fixation au moyen de l'éthanol à 80° bouillant est trop brutale. Il est donc probable que le cycle de Krebs intervienne pour une bonne part dans le métabolisme intermédiaire de la respiration.

L'acide oxalique existe en quantité non négligeable dans les feuilles de maïs vert et albinos.

Quelques acides n'ont pas été identifiés. Nous les avons désignés par X_1, X_2, X_3, X_4, X_5 dans leur ordre de sortie :

— X_1 donne sur papier un spot légèrement au-dessus de l'acide fumarique.

— X_2 a un $rf < rf$ fumarique.

— X_3 ne marque pas sur papier.

— X_4 : pas de spot sur papier.

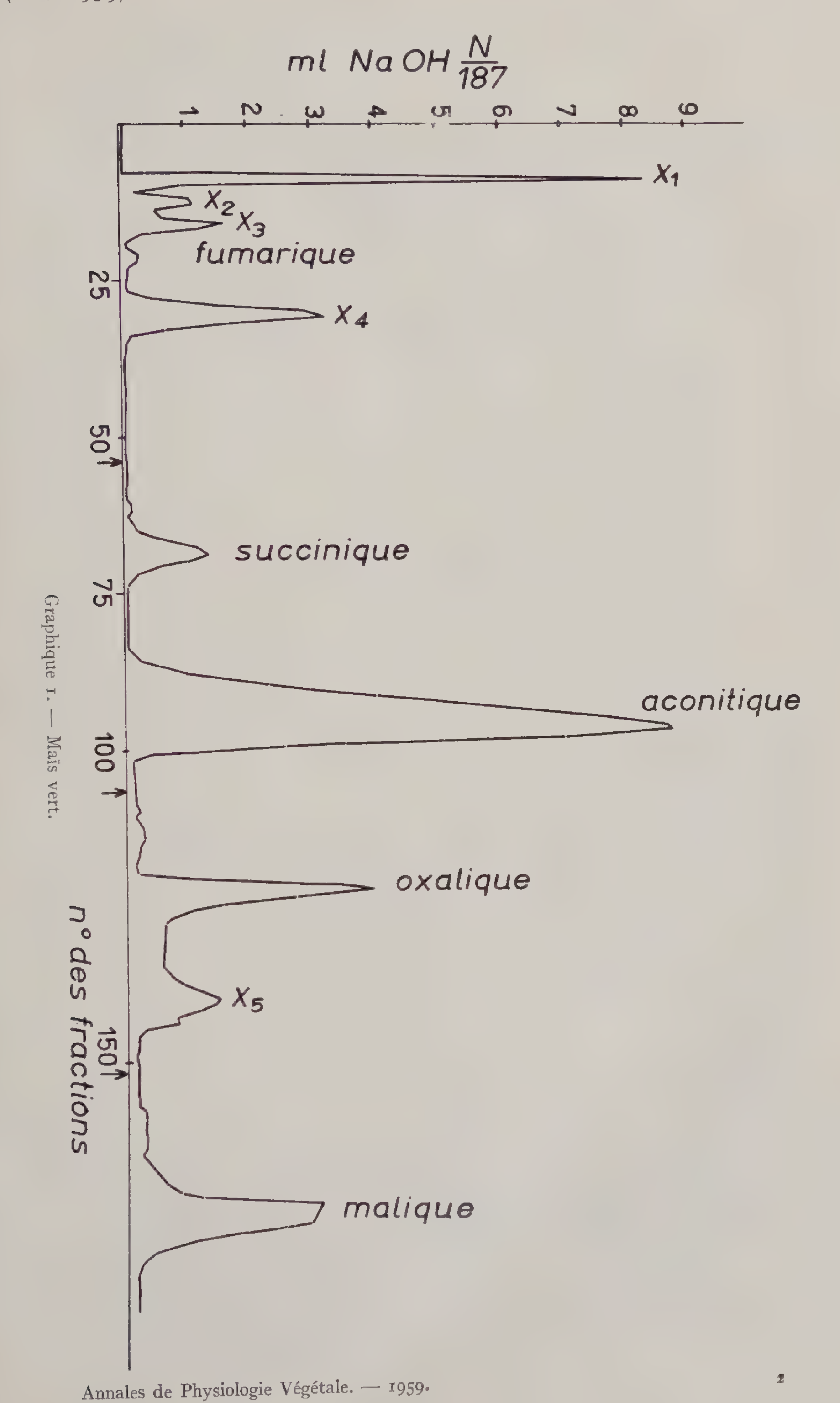
Cet acide X_4 a exactement le même niveau de sortie que l'acide formique. Il est également volatil et la réaction du miroir d'argent semble positive, ce qui indiquerait la présence d'un groupement aldéhydique — CHO ou cétonique — CO —.

— X_5 : le pic d'acidité X_5 donne deux spots sur papier :

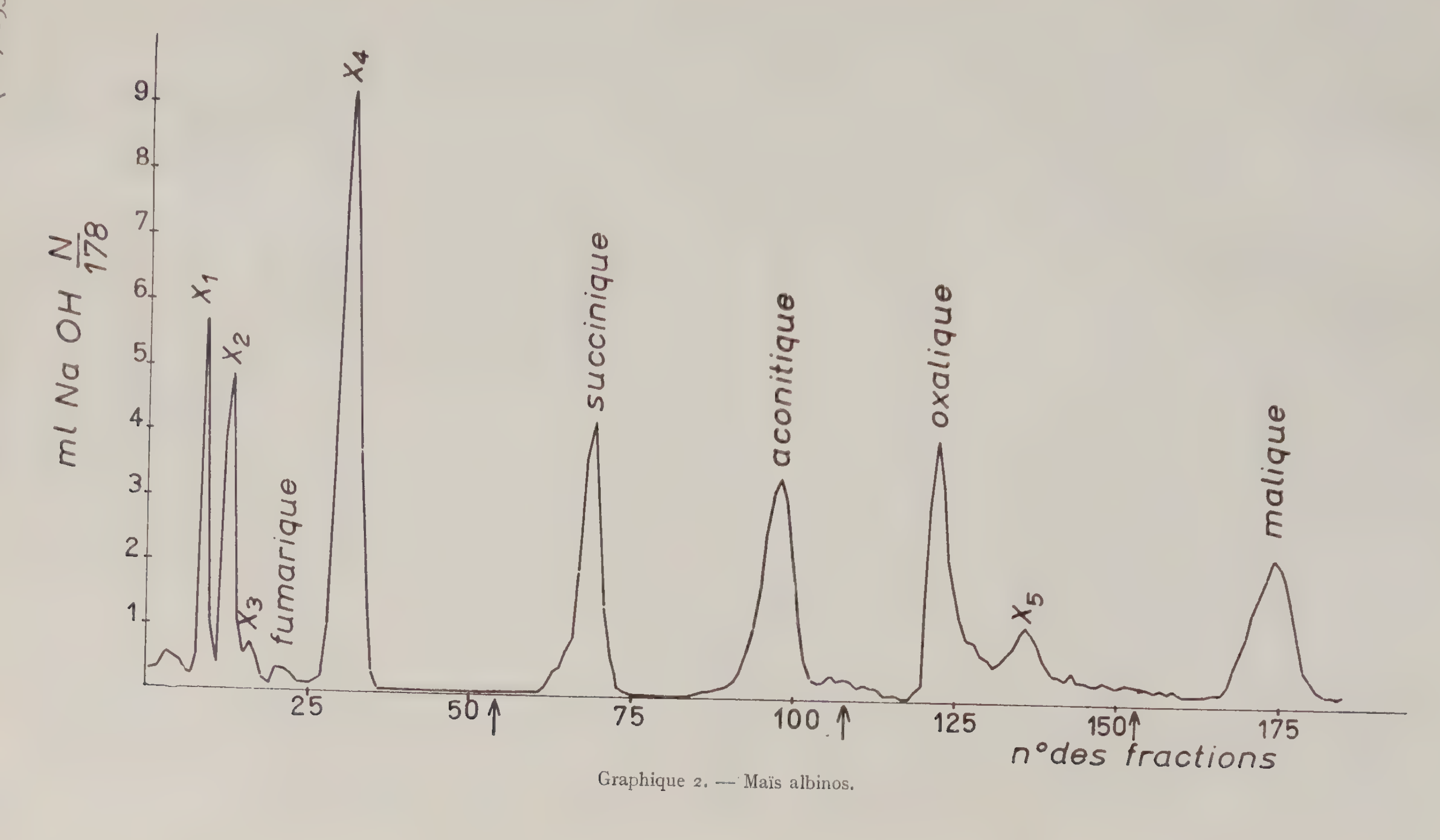
— l'un à $rf \neq rf$ fumarique ;

— l'autre à $rf < rf$ malique.

La chromatographie sur papier nous a permis d'identifier l'acide citrique dans les fractions allant du tube 200 au tube 210. Mais l'acide citrique n'est pas seul et il n'est pas possible de déterminer sa quantité. Il est élué avec des acides minéraux et un acide à $rf < rf$ malique.



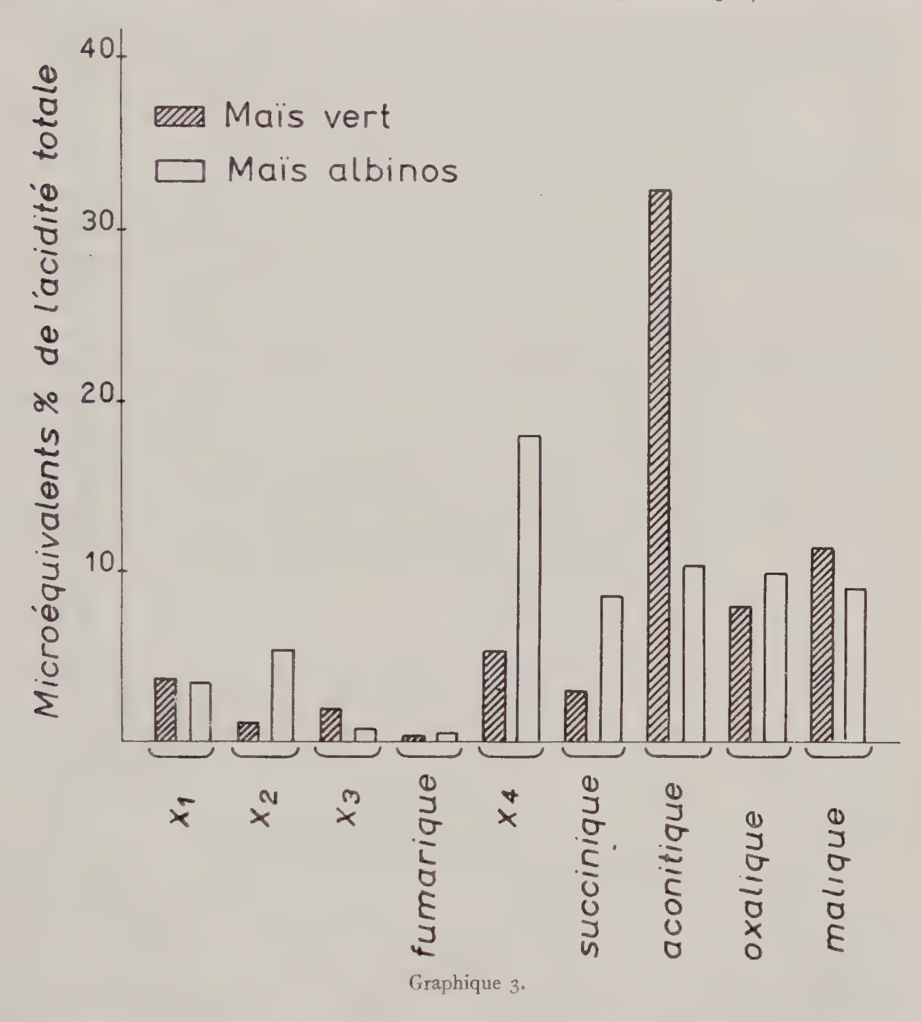
Graphique 1. — Maïs vert.



Graphique 2. — Maïs albinos.

Le mélange éluant n° 6 ne donne pas de pic bien net, mais une sorte de palier plus ou moins régulier. Sur papier on observe un spot correspondant à un *rf*>*rf* quinique.

Il est possible que les feuilles de maïs contiennent des acides du type cyclohexanique (quinique) ou cyclohéxénique (shikimique) et il serait



Graphique 3.

intéressant de faire une chromatographie d'échange d'ions sur une résine du type Dowex I qui sépare bien les acides hydroaromatiques.

Sur les graphiques 1 et 2 nous n'avons pas représenté les acides sortant après l'acide malique. Ces acides sont d'ailleurs mal séparés.

Le graphique 3 illustre les différences entre les acides des feuilles du maïs vert et du maïs albinos.

Nous avons porté en ordonnée le nombre de microéquivalents pour cent de l'acidité totale.

L'examen de ce graphique nous permet de faire les constatations suivantes :

1° Dans les feuilles du Maïs vert l'acide aconitique est de très loin le plus important du point de vue quantitatif.

Ceci constitue une différence fondamentale avec d'autres plantes étudiées jusqu'à présent et qui ne contiennent que des traces ou pas du tout d'acide aconitique (Bryophyllum, pomme de terre, féverole, etc...).

2° Les quantités des acides fumarique, oxalique et malique sont pratiquement identiques chez le maïs vert et le maïs albinos. On remarque que l'acide oxalique se rencontre en quantité relativement importante dans les feuilles de maïs.

3° Dans les feuilles de maïs albinos les acides succinique, aconitique, oxalique et malique ont approximativement la même importance quantitative.

4° En ce qui concerne les acides inconnus, X_4 est le plus abondant dans le maïs albinos. Cet acide étant volatil, nous ne pouvons le déterminer quantitativement par cette méthode, mais dans la comparaison entre les feuilles de maïs vert et de maïs albinos le rapport reste proche de la réalité car nous avons opéré dans les mêmes conditions expérimentales. Le maïs albinos est 3,3 fois plus riche en X_4 que le maïs vert.

X_1 présente sensiblement la même valeur dans les deux types de maïs.

Par contre on trouve 4,6 fois plus d'acide X_2 dans le maïs blanc que dans le maïs vert.

5° Pour les acides identifiés les différences les plus spectaculaires entre le maïs vert et le maïs blanc concernent l'acide aconitique (3 fois plus dans le vert que dans le blanc) et l'acide succinique (2,8 fois plus dans le blanc).

Cette accumulation d'acide succinique dans le maïs blanc peut être le résultat :

— soit d'une différence de vitesse, dans le déroulement du cycle de Krebs, entre les deux tronçons de part et d'autre de l'acide succinique. Il y aurait dans ce cas un hypofonctionnement du cycle au-delà de l'acide succinique (de l'acide succinique à l'acide oxalacétique, en passant par les acides fumarique et malique) ;

— soit d'une inhibition de la succino-oxydase par un inhibiteur quelconque.

— soit de l'absence ou d'une concentration insuffisante d'un des éléments du complexe enzymatique de la succino-oxydase dont l'intégrité est indispensable au transport des protons H^+ et des électrons sur l'oxygène moléculaire dans le déroulement de la respiration. Il serait intéressant de déterminer l'activité de la succino-déshydrogénase avec un appareil de Warburg.

Il est également possible que cette accumulation d'acide succinique soit une conséquence génétique ou le produit d'un métabolisme différent de celui de la respiration.

Résumé :

Nous avons comparé les acides organiques des feuilles de maïs vert normal et de maïs albinos en utilisant la technique de chromatographie de partage sur gel de silice.

Dans les feuilles de maïs vert l'acide aconitique est nettement le plus abondant.

Dans les feuilles de mals albinos on note une certaine accumulation d'acide succinique.

L'acide oxalique est relativement abondant dans les feuilles de maïs, et existe en quantité identique dans les deux types.

Il existe un certain nombre d'acides indéterminés dont les variations sont intéressantes et qui doivent jouer un rôle physiologique important.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Roux (L.) et Lesaint (Mme). — *Ann. physio. vég.*, N° 1, 1959.
(2) Isherwood (F. A.). — *Biochim.* **J.**, **40**, P. 688-695, 1946.
(6) Bove (J.) et Raveux (R.). — *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1957.

ÉVOLUTION DE L'ARGININE DANS LE TUBERCULE DE TOPINAMBOUR AU COURS DU CYCLE VÉGÉTATIF

PAR

H. DURANTON

Station centrale de Physiologie végétale, Versailles

PLAN DU MÉMOIRE

I. — INTRODUCTION

L'arginine libre forme une part importante de la réserve azotée de certains organes végétaux à l'état de repos. On en rencontre de grandes quantités : soit dans les graines de certaines plantes — légumineuses comme le haricot ou le pois, conifères, comme le pin ou le sapin — ; soit dans les racines ou rhizomes de certaines composées, comme la chicorée, le dahlia ou le topinambour.

Les rhizomes de cette dernière plante sont particulièrement riches en arginine. C'est ainsi que ceux de la variété Blanc commun peuvent en contenir, pendant le repos hivernal, plus de 300 mg pour 100 g de matière

fraîche, ce qui représente environ 80 p. 100 de l'azote aminé libre des tissus. Cette teneur extrêmement élevée nous a incité à suivre l'évolution de cet amino-acide dans le rhizome au cours du cycle végétatif de la plante.

Avant d'exposer les résultats expérimentaux que nous avons obtenus au cours de cette étude, nous rappellerons, dans un bref historique, les connaissances acquises, par les biologistes, sur le métabolisme de l'arginine chez les êtres vivants. Cette mise au point est nécessaire au début d'un exposé qui constitue le premier d'une série d'articles consacrés à l'analyse du métabolisme de l'arginine dans les tissus du tubercule de Topinambour (1).

II. — MÉTABOLISME DE L'ARGININE CHEZ LES VÉGÉTAUX SUPÉRIEURS

Il est curieux de constater que l'arginine, bien que mise en évidence depuis plus de cinquante ans chez les végétaux, n'ait pas encore trouvé sa place dans les grandes voies du métabolisme de la plante. Les travaux relatifs à cet amino-acide, dans le cadre de la physiologie végétale, sont peu nombreux, comme nous allons pouvoir le constater dans les lignes qui suivent.

Cet amino-acide fut en effet découvert, en 1886, par SCHULZE et STEIGER (21) dans la graine de lupin (*Lupinus luteus*) et la citrouille (*Cucurbita pepo*). On l'a, depuis, mis en évidence dans la plupart des végétaux : champignons, conifères et plantes supérieures. Chez ces dernières, il est surtout abondant dans les organes de réserve. C'est ainsi qu'on en trouve des quantités importantes à l'état libre dans certaines graines (légumineuses, conifères) et dans des bulbes ou tubercules (topinambour, dahlia, tulipe). Sa localisation dans la plante est parfois plus précise encore puisque SCHULZE et WINTERSTEIN, dans le pois, situent l'arginine dans le grain alors que la cosse renferme surtout de l'asparagine. EULER et BURSTRÖM (6), dans une variété de Pelargonium, signalent que les parties des feuilles panachées, privées de chlorophylle, sont beaucoup plus riches en arginine que les parties vertes.

Bien entendu, on retrouve l'arginine à des taux plus ou moins élevés dans toutes les protéines végétales.

Dès qu'il eut découvert l'arginine, SCHULZE rechercha le rôle que cet amino-acide peut jouer dans la plante et les transformations qu'il y subit. En travaillant avec des graines de lupin, il remarqua qu'il dispa-

(1) Il est prévu dans les Annales de Physiologie Végétale un article relatif à l'évolution des acides aminés libres dans les fragments de tubercules de topinambours cultivés *in vitro*, et un article précisant le sort des atomes de la molécule d'arginine au cours de sa dégradation par les tissus du topinambour.

raît au cours de la germination et souligna un fait important : sa décomposition dans la graine a lieu sans que la teneur en azote total diminue. Elle se produit donc sans qu'il y ait perte d'azote.

C'est SCHULZE également qui, en 1896, montra que les graines de gymnospermes ont une teneur en arginine élevée. ([22]) Ces résultats furent confirmés en 1932 par KLEIN et TÄUBOCK (13). Plus récemment, GUITTON (8) a recherché dans ces graines (*Abies pectinata*, *Pinus pinea*, *Cedrus atlantica*) les enzymes qui transforment l'arginine. Il y a caractérisé l'arginase et l'uréase ; ces enzymes sont surtout localisées dans le nucelle.

Cependant, ce n'est qu'au cours de ces dernières années que le métabolisme de l'arginine chez les végétaux a été abordé d'une manière plus approfondie, grâce aux nouvelles techniques d'analyse et de dosage par chromatographie. C'est ainsi que BOULANGER, CLAVEAU et BISERTE (4) en travaillant avec la graine de haricot, matériel déjà étudié par SCHULZE, ont suivi l'évolution de l'arginine en fonction du temps au cours de la germination. Malheureusement, cet organe renferme, en plus de l'arginine, une quantité importante d'acide pipécolique qui, lui aussi, se transforme au cours de la germination. Si bien qu'il leur a été difficile de tirer des conclusions précises sur les transformations subies par l'arginine. Ils terminent leur travail en disant que leurs observations laissent entrevoir la complexité des transferts d'azote lors du remaniement nécessité par l'édification de tissus nouveaux aux dépens des réserves de la graine. Le bulbe de tulipe renferme également une grande quantité d'arginine, puisque cet amino-acide constitue souvent plus de 45 p. 100 de l'azote soluble. ZACHARIUS, CATHEY et STEWARD (24) ont recherché les transformations subies par ce métabolite au cours de l'initiation florale et du développement de la plante. Ils n'ont observé aucune transformation des formes de l'azote au cours de l'ébauche florale. Par contre, dès que ce stade est terminé et que les feuilles se développent, d'importants changements se produisent et l'arginine, qui est un constituant essentiel du bulbe au repos, disparaît pour faire place à de la glutamine, que l'on retrouve ensuite dans les feuilles.

D'autres auteurs, comme KASTING et DELWICKE ([11]) ont recherché si le cycle de l'ornithine, découvert par KREBS et HENSELEIT chez les animaux supérieurs, n'existait pas chez les plantes. Ils ont, pour cela, travaillé avec des plantules de pastèque, qui contiennent une grande quantité d'arginine et de citrulline. En fournissant à la plante de l'arginine et de l'ornithine marquées avec du radio-carbone, ils ont prétendu retrouver l'activité du carbone dans les autres composants du cycle : citrulline et urée. Ils ont cependant constaté que l'ornithine se transformait rapidement en acide glutamique.

Dans un travail plus récent (12) ils ont à nouveau cherché à caracté-

riser l'urée et l'ornithine dans ce même matériel. Malheureusement, ils se montrent beaucoup moins affirmatifs quant au fonctionnement du cycle de l'ornithine et concluent en disant que la présence de l'arginine et de la citrulline dans cette plante ne met pas en lumière leur fonction dans le métabolisme de la plante.

Bien que le rôle de l'arginine dans la plante normale n'ait pas encore été établi avec certitude, d'autres chercheurs ont néanmoins tenté d'élucider les transformations subies par cette substance dans les plantes malades, carencées en différents éléments. C'est ainsi que COLEMAN et HEGARTY (5) ont comparé le métabolisme de l'ornithine et de la citrulline chez des plants d'orge et de trèfle blanc se développant soit sur un milieu complet soit sur des milieux carencés en potassium. En faisant absorber à ces plantes carencées par des tiges coupées, de l'ornithine marquée au ^{14}C en position 2, ils ont retrouvé, par chromatographie sur papier, de l'activité dans l'arginine, la citrulline, la proline et la putrescine. Par contre, dans des extraits de plantes normales, traitées de la même manière, l'activité se retrouve bien dans ces mêmes amino-acides, mais la putrescine n'est pas marquée.

En opérant de la même manière avec de la l-citrulline marquée au carbone 14 sur le groupe carbamyl, l'activité passe cette fois dans l'arginine et il se forme en même temps des traces d'urée. Enfin, en fournissant de l'arginine radio-active, ils constatent que cette dernière se transforme en citrulline et en proline. Étant donné que l'ornithine ^{14}C produit dans une forte proportion de la proline, ces auteurs pensent que cette transformation suit un mécanisme biochimique identique à celui qui a été étudié dans *Neurospora crassa* (23). Chez cet organisme, en effet, la technique des mutants a permis de mettre en évidence les intermédiaires suivants : l'ornithine, par désamination oxydative, produit la γ-semialdéhyde glutamique, qui se cyclise en acide Δ pyrroline - 5 - carboxylique, lui-même réduit en proline. Ils pensent d'autre part que toutes les enzymes qui, chez les animaux, participent au cycle de Krebs - Henseleit doivent être présentes dans ces plantes.

Dans certains cas pathologiques, des quantités anormales d'arginine peuvent s'accumuler dans les organes végétaux. Ce phénomène a été décrit par W. HOLLEY et J. CAIN (10) chez différents végétaux, comme l'airelle, le pommier et le magnolia chlorosés par une carence en fer. On savait depuis longtemps qu'à la suite de cette carence, la teneur en azote soluble des feuilles augmentait. HOLLEY et CAIN ont montré que cette augmentation était due à une accumulation d'arginine qui disparaît dès que l'on supprime la carence.

Une carence en soufre produit le même phénomène chez la luzerne. MERTZ et MATSUMOTO (18) ont cherché à expliquer cette accumulation de la manière suivante. On sait que chez les *Neurospora* (23) la suite des

réactions qui aboutit à l'arginine est la suivante : l'acide glutamique forme de l'ornithine qui se transforme successivement en citrulline et en arginine, la molécule d'ammoniaque nécessaire au passage de la citrulline à l'arginine provenant de l'acide aspartique. Or, au cours de la formation d'arginine chez la luzerne carencée en soufre, MERTZ et MATSUMOTO ont trouvé une diminution de la teneur en acide glutamique d'une part. Ils ont, d'autre part, constaté que cette plante renferme une forte quantité d'asparagine. Ils supposent donc que l'acide glutamique subit les mêmes transformations que chez les *Neurospora*, l'ammoniaque nécessaire à la synthèse de l'arginine étant ici fourni par l'asparagine.

Cette revue nous montre combien sont limitées nos connaissances sur les transformations de l'arginine dans la plante. Fort heureusement, le métabolisme de cet acide aminé basique a été étudié d'une manière approfondie chez les animaux et les micro-organismes.

III. — MÉTABOLISME DE L'ARGININE CHEZ LES ANIMAUX SUPÉRIEURS ET LES MICROORGANISMES

Chez les êtres vivants, l'arginine est certainement l'acide aminé qui possède le métabolisme le plus complexe. La raison en est simple : cette molécule présente trois points vulnérables, qui entraînent des mécanismes de déguanidylation, de décarboxylation et de désamination. Examinons en premier lieu les réactions liées au groupement guanidyle.

Mécanismes de déguanidylation.

KOSSEL et DAKIN (14) ont été les premiers à mettre en évidence, dans le foie des mammifères, la présence d'une enzyme qui catalyse l'hydrolyse de l'arginine en urée et ornithine, suivant la réaction :

arginine + eau → urée + ornithine

Cette enzyme, l'arginase, est caractérisée par une spécificité étroite et les produits de la réaction sont : soit éliminés tels quels par l'organisme (c'est le cas de l'urée chez les animaux uréothéliques), soit, comme c'est le cas pour l'ornithine, introduits dans le cycle de KREBS-HENSELEIT (15) pour régénérer l'arginine.

Mais l'arginase n'est pas la seule déguanidase connue. SANO et NAKAMURA (19) ont étudié une hétéro-arginase qui diffère de l'arginase par une spécificité beaucoup moins étroite puisqu'elle peut attaquer, suivant le même mécanisme, l'acide arginique, les acides ω guanido-caproïque, valérianique, butyrique, propionique et acétique, ainsi que divers autres guanidoxy ou hydroxy acides.

Si, dans les deux cas qui viennent d'être étudiés, l'uréase est absente, l'un des produits finaux est l'urée. Mais HILLS (9) a observé, en travaillant avec des streptocoques ne comportant pas dans leur bagage enzymatique d'uréase que l'arginine donne naissance directement à de l'ornithine et à de l'ammoniaque. Nous sommes donc en présence ici d'une enzyme différente des précédentes. Cette enzyme, l'arginine dihydrolase, est responsable, d'après HILLS, de la réaction suivante :

$$\text{arginine} + \text{eau} \rightarrow \text{ornithine} + 2NH_2 + CO_2$$

L'existence de l'arginine dihydrolase a été vérifiée par GALE (7) qui a confirmé l'absence d'uréase chez les streptocoques ayant servi de matériel d'étude. Ces résultats ont par la suite, été corroborés par un grand nombre d'auteurs.

L'hydrolyse partielle du groupement guanidique, qui a été entrevue dès 1913 par ACKERMANN (1) a été confirmée par LINNEWEH (16). Cet auteur a signalé, chez les bactéries de la putréfaction, la présence d'une guanidodésimidase. Cette enzyme donne naissance, en agissant sur une guanidine, à un uréide et à de l'ammoniaque. D'après ces auteurs, la réaction serait :

$$\text{arginine} + \text{eau} \rightarrow \text{citrulline} + NH_3$$

A la suite de ces observations, SEKINE et AKAMATSU (2) pensent que, dans le cas de l'arginine dihydrolase, on a, en fait, un complexe de deux enzymes, donnant lieu aux réactions suivantes :

$$\text{arginine} + \text{eau} \rightarrow \text{citrulline} + NH_3$$
$$\text{citrulline} + \text{eau} \rightarrow \text{ornithine} + NH_3 + CO_2$$

La complexité des réactions liées à la fragilité de cette partie de la molécule d'arginine a été soulignée par BORSOOK et DUBNOFF (3) qui ont montré que l'arginine, en présence de glycine, peut donner naissance à de l'ornithine et à de la glycocyamine. Nous sommes ici devant un simple transfert du groupement guanidique sur la glycine.

Mécanismes de décarboxylation.

GALE (7) a pu démontrer que ces mécanismes sont fréquents chez les bactéries, contrairement à ce que l'on observe chez les vertébrés ou les invertébrés. Ils donnent naissance à de l'agmatine.

$$HN = C \begin{cases} NH_2 \\ NH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - \underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}} - COOH \end{cases}$$

$$\longrightarrow HN = C \begin{cases} NH_2 \\ NH - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - NH_2 \end{cases}$$

Nous signalerons simplement, pour terminer cette revue, le troisième point faible de la molécule. Il se situe au niveau du carbone α et est caractéristique des acides aminés en général.

Mécanismes de désamination.

Les mécanismes en sont variés et font intervenir des processus oxydatifs, réducteurs, hydrolytiques ou d'oxydo-réduction couplés. Ils conduisent tous, soit à l'acide cétonique, soit à l' α-hydroxy acide, soit à l'acide gras correspondant.

IV. — ÉVOLUTION DE L'ARGININE DANS LE TUBERCULE DE TOPINAMBOUR AU COURS DU CYCLE VÉGÉTATIF

Après avoir étudié le métabolisme de l'arginine chez les êtres vivants, examinons les variations de la teneur en arginine du tubercule de Topinambour prélevé en plein champ, au cours du cycle végétatif de la plante.

Ce dernier présente les différentes phases suivantes :

Vers la fin du mois d'avril, le repos hivernal du Topinambour étant terminé, les bourgeons de ses rhizomes entrent en végétation. Ils donnent naissance à une tige qui atteindra son développement maximum en juillet-août. Cette tige dressée, souvent ramifiée dans sa partie inférieure, est très vigoureuse et peut atteindre deux mètres de hauteur. Le Topinambour est une plante de jours courts et la variété « Blanc commun » que nous utilisons, donne naissance, sous nos climats, à des ébauches florales, vers la fin septembre. Ces ébauches évoluent rarement en fleur. Lorsque la saison est avancée, en novembre, les tiges et les feuilles se dessèchent. La pérennité de l'espèce est assurée par les nouveaux tubercules qui ont commencé leur développement au mois de juillet, pour l'achever fin octobre. Ils peuvent sans dommage passer l'hiver en pleine terre, où l'on viendra les récolter au fur et à mesure des besoins. Nous avons effectué ces récoltes de tubercules en plein champ à intervalles rapprochés (tous les mois, puis tous les huit jours) afin d'analyser, par la technique de SAKAGUCHI [1] leur teneur en arginine libre. Les résultats de ces analyses sont consignés dans le tableau I et le graphique n° 2.

Nous avons ainsi pu observer les variations suivantes : au moment où cesse le repos hivernal, vers la fin du mois d'avril, le bourgeon terminal du tubercule se gonfle et les premières racines apparaissent. A cette époque, la teneur en arginine du rhizome, qui n'a pas sensiblement varié au cours de l'hiver, est encore très élevée. Mais tandis que la nouvelle

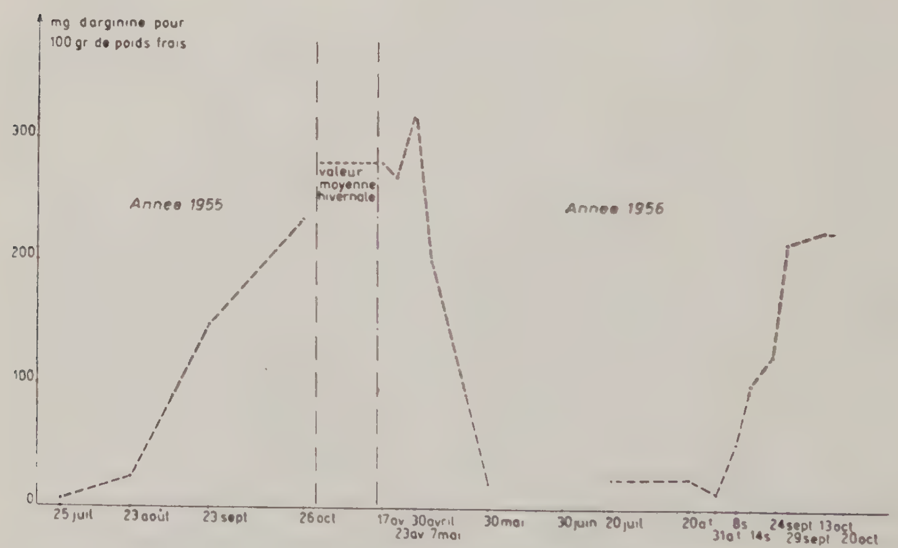
[1] La technique utilisée a été mise au point par Mac PHERSON H. T. The basic amino-acids content of proteins. Biochem. J., **40**, 470-481, 1946.

tige se développe rapidement, on constate une brusque chute de la quantité d'arginine présente dans le tubercule. En moins d'un mois, dans le courant de mai, elle passe de 250 mg environ à 20 mg pour 100 g de poids

TABLEAU I

Dates	Quantité d'arginine en milligrammes pour 100 g de poids frais	Dates	Quantité d'arginine en milligrammes pour 100 g de poids frais
Mars 1954	163 mg	7 mai 1956	199 mg
Novembre 1954	331 mg	30 mai 1956	21 mg
22 mars 1955	151 mg	20 juillet 1956	24 mg
9 juin 1955 (vieux tubercules)	4 mg	31 août 1956	12 mg
25 juillet 1955	24 mg	8 septembre 1956	52 mg
23 septembre 1955	149 mg	14 septembre 1956	93 mg
26 octobre 1955	234 mg	24 septembre 1956	124 mg
17 avril 1956	280 mg	29 septembre 1956	214 mg
23 avril 1956	269 mg	13 octobre 1956	224 mg
30 avril 1956	323 mg	20 octobre 1956	214 mg

frais. A ce moment-là, le tubercule ayant épuisé ses réserves commence à se décomposer. Cependant la plante poursuit son développement et va donner naissance à de nouveaux tubercules. Ces derniers se forment



Variations de la teneur en arginine des tubercules de Topinambour prélevés en plein champ au cours de l'année.

GRAPHIQUE n° 2.

à la mi-juillet. Ils demeurent extrêmement petits, 5 à 20 g. jusqu'à la fin du mois d'août. Au cours de cette période, leur teneur en arginine reste faible (10 à 20 mg d'arginine pour 100 g de poids frais). Mais, brusquement, au mois de septembre, alors que la croissance du tubercule

se manifeste, on voit la quantité d'arginine passer de 20 à 300 mg pour 100 g de matière fraîche. Le rhizome, qui peut atteindre un poids de 120 à 150 g au début du mois d'octobre, poursuit son développement à un rythme beaucoup plus lent jusqu'à une période avancée de l'hiver sans que sa composition varie dans de larges limites. Elle oscille autour des chiffres suivants : 77 p. 100 d'eau, 22 p. 100 de matière sèche, 2 p. 100 d'azote total composé pour plus de 4 p. 100 par les azotes de l'arginine libre.

V. — CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES

A la suite de ces observations sur les variations de la teneur en arginine du tubercule, on peut arbitrairement diviser le cycle de développement du Topinambour en trois périodes très nettes :

1° Une phase d'anabolisme de l'arginine ;

2° Une période de repos hivernal ;

3° Une phase de catabolisme de la molécule.

Comment peut-on interpréter de tels phénomènes et en premier lieu la brusque accumulation d'arginine dans le tubercule au cours du mois de septembre?

Le Topinambour est une plante de jours courts. Il ne fleurit que lorsque la photopériode est inférieure à 13 h. Ses ébauches florales apparaissent précisément au moment où la synthèse de l'arginine est la plus intense. On peut donc se demander si cette synthèse n'est pas en relation avec la durée de l'éclairement.

Une telle influence de la lumière sur le métabolisme de l'arginine est très plausible puisqu'elle a déjà été observée par Racusen D. W. et Aronoff S. (20) sur le Soja, plante de jours courts comme le Topinambour. Ces auteurs ont fait absorber à des feuilles détachées de cette plante du $^{14}CO_2$ soit à la lumière, soit à l'obscurité. Ils ont pu constater qu'à la lumière les feuilles synthétisent peu d'arginine et que la faible radioactivité que l'on peut déceler dans cet amino-acide se retrouve seulement dans les protéines. Par contre, à l'obscurité, un phénomène inverse est observé : l'arginine contient la majeure partie de la radioactivité de la fraction aminée libre tandis qu'on ne peut pas déceler d'arginine marquée dans les protéines. En dégradant la molécule, Racusen et Aronoff ont montré que 75 p. 100 de l'activité de l'arginine sont représentés par le carbone du groupement amidine. Ils ont interprété ce résultat comme étant dû à la présence d'un cycle de l'ornithine dans le végétal. Si de tels phénomènes ont lieu chez le Topinambour, ils permettent d'expliquer l'accumulation d'arginine dans ses tissus. En effet, nous avons constaté que les tubercules qui se forment dès le mois de juin n'accumulent de l'arginine qu'à partir du mois de septembre, c'est-à-dire à une

époque où les jours vont atteindre moins de 12 h. Les feuilles de Topinambour, dans ces conditions, synthétisent de l'arginine qui, ne pouvant être incorporée dans les protéines, est exportée vers le tubercule, où elle s'accumule constituant la réserve azotée nécessaire au développement de la future jeune plantule.

Cependant, dans ces phénomènes, il peut s'agir, non pas tant d'une question de photopériode, que d'une question d'intensité lumineuse. En effet, en étudiant la formation de tubercules, en cultivant *in vitro*

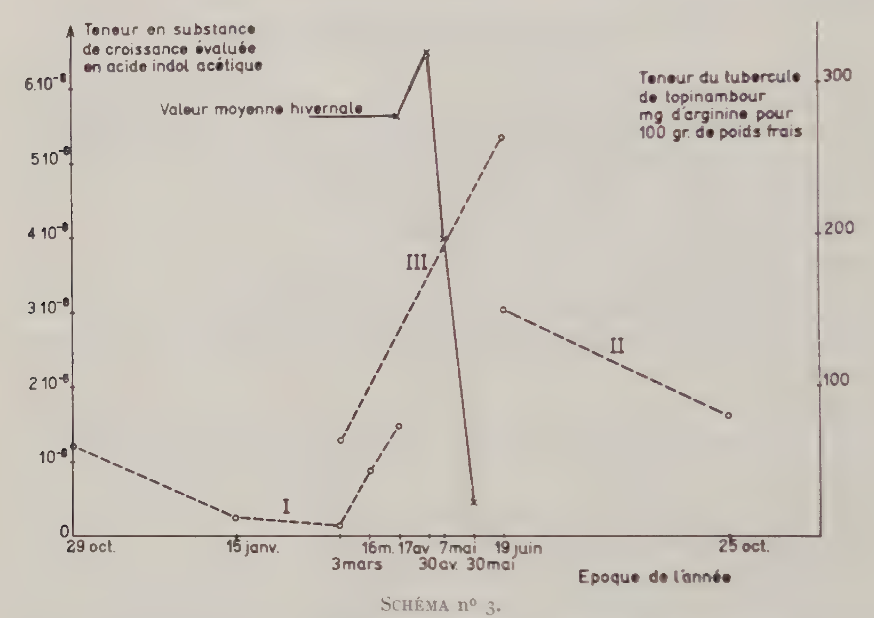


SCHÉMA n° 3.

Variations des teneurs en auxine et en arginine des tubercules de Topinambour à différentes époques de l'année.
Courbe I. — Variations de la teneur en auxine de tubercules mûrs depuis le moment de la récolte (octobre) jusqu'à celui de la germination (avril).
Courbe II. — Variations de la teneur en auxine dans de jeunes tubercules en voie de développement.
Courbe III. — Élaboration d'auxine par les tiges feuillées issues de la germination des tubercules.
Courbe en trait plein. — Variation de la teneur en arginine du tubercule pendant le repos hivernal et au moment de la germination.

de jeunes pousses d'*Helianthus tuberosus* L., Margery P. F. MARDSEN RAY (17) a montré que cette formation était surtout sous la dépendance soit d'une baisse de l'intensité lumineuse, soit d'une diminution de la température.

Nous pensons que des cultures de tissus et d'organes *in vitro* permettraient d'étudier le rôle de la lumière dans la synthèse de l'arginine.

En ce qui concerne la disparition de l'arginine dans le tubercule au mois de mai, on peut émettre l'hypothèse qu'elle est sous la dépen-

dance de l'auxine. En effet, si l'on superpose, d'une part, les graphiques indiquant les variations de la teneur en auxine des tubercules de topinambour au cours du cycle végétatif, et d'autre part les variations de leur teneur en arginine, on constate que cette dernière diminue dans le rhizome précisément au moment où la quantité d'auxine qu'il contient augmente (schéma nº 3).

Nous verrons dans un prochain article que des faits expérimentaux viendront justifier cette hypothèse.

VI. — **CONCLUSIONS**

Au cours de ce travail, nous avons pu mettre en évidence la grande richesse en arginine libre du tubercule de Topinambour pendant le repos hivernal. Or le parenchyme vasculaire de cet organe est un excellent matériel pour la technique des cultures de tissus. En effet, comme GAUTHERET l'a montré dès 1940, ce tissu prolifère très activement lorsqu'on le cultive *in-vitro* sur des milieux gélosés contenant une auxine à des concentrations comprises entre 10^{-6} et 10^{-8}. Nous avons pensé que cette technique devrait permettre l'étude biochimique des transformations que subit un métabolite dans la cellule végétale avec autant de facilité qu'en offrent les cultures de microorganismes tels que le *Neurospora Crassa* ou l'*Escherichia coli*, par exemple. C'est pourquoi nous avons songé à appliquer les techniques de cultures des tissus à l'étude du métabolisme de l'arginine dans les tissus du Topinambour. Nous exposerons dans une prochaine publication les résultats obtenus dans ces conditions.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) ACKERMANN (D.). — The fermentative decomposition of Creatinine. *Z. Biol.*, **62**, 208-216, 1913.

(2) AKAMATSU (S.), SEKINE (T.). — Hydrolysis of arginine by *Streptococcus Faecalis*. *J. Biochem.* (Japan), **38**, 349-354, 1951.

(3) BORSOOK (H.), DUBNOFF (J. W.). — The formation of glycocyanine in animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **138**, 389-403, 1941.

(4) BOULANGER (P.), CLAVEAU (J.), BISERTE (G.). — Evolution des acides aminés libres des graines de haricot (*Phaseolus vulgaris*) au cours de la germination. *C. R. Acad. Sci.*, **241**, 577-579, 1955.

(5) COLEMAN (R. G.), HEGARTY (M. P.). — Metabolism of dl ornithine 2. ^{14}C in normal and potassium deficient barley. *Nature*, **179**, 376-377, 1957.

(6) EULER (H.), BURSTRÖM (D.). — Messunger über den Arginingehalt im chlorophylldefekten Blättern. *Z. Physiol. Chem.*, **215**, 47-50, 1933.

(7) GALE (E. F.). — The production of amines by bacteria. *Biochem. J.*, **34**, 846-852, 1940.

(8) GUITTON (Y.). — Sur le métabolisme azoté des gymnospermes. Présence de l'arginase dans les graines. *C. R. Acad. Sci.*, **245**, 1157-1160, 1957.

(9) HILLS (G. M.). — The metabolism of amino-acids by Streptococci. *Chem. & Indus.*, **58**, 1086, 1939.

(10) Holley (R. W.), Cain (J. C.). — Accumulation of arginine in plants afflicted with iron deficiency type chlorosis. *Science*, **121**, 172-173, 1955.
(11) Kasting (R.), Delwiche (C. C.). — Ornithine, Citrulline, Arginine interconversions in higher plants. *Plant Physiol.*, **30**, suppl. 28, 1955.
(12) Kasting (R.), Delwiche (C. C.). — The presence of Ornithine cycle amino-acids in some higher plants. *Plant Physiol.*, **32**, 471-475, 1957.
(13) Klein (G.), Täubock (K.). — Argininstoff wechsel und Harnstoffgenese bei höheren Pflanzen. *Biochem. Z.*, **251**, 10-50, 1932.
(14) Kossel (A.), Dakin (H. D.). — Uber die Arginase. *Z. Physiol. Chem.*, **41**, 321-331, 1904.
(15) Krebs (H. A.), Henseleit (K.). — Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Z. Physiol. Chem.*, **210**, 33-66, 1932.
(16) Linneweh (F.). — Uber die Resistenz des Guanidins und alkylierter Guanidine gegenüber bakterieller Guanidodesimidase und Arginase. *Z. Physiol. Chem.*, **207**, 152-156, 1932.
(17) Mardsen Ray (M. P. F.) — Formation of Jerusalem Artichoke tubers in sterile culture. *Nature*, **181**, 1480-1482, 1958.
(18) Mertz (E. T.), Matsumoto (H.). — Further studies on the amino-acids and proteins of sulfurdeficient Alfalfa. *Arch. Biochem. and Biophys.*, **63**, 50-63, 1956.
(19) Nakamura (S.). — Uber die Spezifität der Arginase. *J. Biochem.* (Japan), **36**, 243-261, 1944.
(20) Racusen (D. W.), Aronoff (S.). — Metabolism of Soybean Leaves. Exploratory Studies in Protein metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.*, **51**, 68-78, 1954.
(21) Schulze (E.), Steiger (E.). — Ueber einen neuen stickstoffhaltigen Bestandtheil der Keimlinge von *Lupinus luteus*. *Ber. Deut. Chem. Ges.*, **19**, 1177-1180, 1886.
(22) Schulze (E.). — Ueber die beim Umsatz der Proteinstoffe in den Keimpflanzen einiger Coniferen-Arten entstehenden Stickstoffverbindungen. *Z. Physiol. Chem.*, **22**, 435-448, 1896.
(23) Vogel (H. J.). — A Symposium on amino-acid metabolism. The John Hopkins Press-Baltimore, 335-353, 1955.
(24) Zacharius (R. M.), Cathey (H. M.), Steward (F. C.). — Nitrogenous compounds and nitrogen metabolism in the Liliaceae. *Ann. Bot.*, **21**, 193-201, 1957.

INFLUENCE DE LA NUTRITION POTASSIQUE ET DE LA NUTRITION AZOTÉE SUR LE RENDEMENT ET LA COMPOSITION MINÉRALE DE PLANTES DE PRAIRIES (Dactyle et Trèfle blanc) CULTIVÉES SEULES OU EN MÉLANGE

PAR

Y. COÏC et J. BOSQUET.
Station centrale de Physiologie végétale, Versailles,
et S. E. C. P. I. A. Argenteuil

I. — INTRODUCTION

Les légumineuses et les graminées ont des exigences très différentes de nutrition minérale, non seulement en ce qui concerne l'azote mais aussi les cations minéraux et plus particulièrement le potassium. La composition minérale des légumineuses et des graminées est très différente : le rapport des cations bivalents par rapport aux monovalents absorbés est beaucoup plus élevé chez les légumineuses que chez les graminées.

Lorsqu'une légumineuse se trouve associée en culture avec une graminée, il s'établit une compétition, influencée fortement par la nutrition minérale et en particulier par les nutritions azotée et potassique.

Une expérience a été conçue pour étudier ces interactions.

II. — PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

L'expérience a été réalisée en vases de végétation sans drainage type Burgevin (1) (5 dm^2 de surface et contenant 10 kg de terre sèche). Nous avons utilisé une terre de limon déficiente en potassium.

A la terre de chaque pot nous avons mélangé successivement 6 g de superphosphate de chaux et 6 g de scories de déphosphoration.

Les combinaisons suivantes étaient réalisées :

1° Trois séries de vases portent :

a) trèfle seul (trèfle blanc, variété Nouvelle Zélande) ;

b) dactyle seul (dactyle pelotonné, variété demi-précoce SII) ;

c) trèfle et dactyle en mélange.

2° Deux types de fertilisation azotée :

a) la moitié des pots ne recevaient pas de fertilisation azotée, c'est-à-dire que les plantes n'avaient à leur disposition que l'azote assimilable fourni par la minéralisation de la matière organique azotée du sol.

b) la moitié des pots recevaient 0,250 g d'azote du nitrate de chaux après chaque coupe, à partir de la deuxième coupe.

3° Trois types de fertilisation potassique :

a) Ko = pas de fertilisation potassique, donc nutrition potassique très déficiente ;

b) K1 = 5 g de CO_3HK au moment de la mise en route de l'expérience (2,35 g de K_2O par pot) ;

c) K2 = 5 g de CO_3HK à la mise en route et 5 g de CO_3HK le 14 juin (4,70 g de K_2O par pot). K2 correspond à une très forte fertilisation potassique.

Les quantités d'eau sont restituées régulièrement de manière que les plantes n'en manquent jamais.

Les prélèvements sous forme de coupes faites à 6 cm au-dessus du sol étaient réalisés aux 6 dates suivantes : 23 mai, 19 juin, 8 juillet, 28 juillet, 3 septembre, 17 octobre.

Techniques analytiques

Les déterminations de K, Mg, Ca ont été faites, après minéralisation préalable par voie sèche et mise en solution chlorhydrique, par spectrophotométrie de flamme (Spectrophotomètre BECKMAN DU) : flamme acétylène-oxygène pour le potassium, flamme hydrogène-oxygène pour le magnésium et le calcium, en tenant compte évidemment des interférences. L'azote a été déterminé par la méthode Kjeldahl.

III. — RÉSULTATS

1° RENDEMENTS

Les quatre graphiques suivants indiquent la récolte cumulée de matière sèche du trèfle et du dactyle croissant seuls ou en mélange.

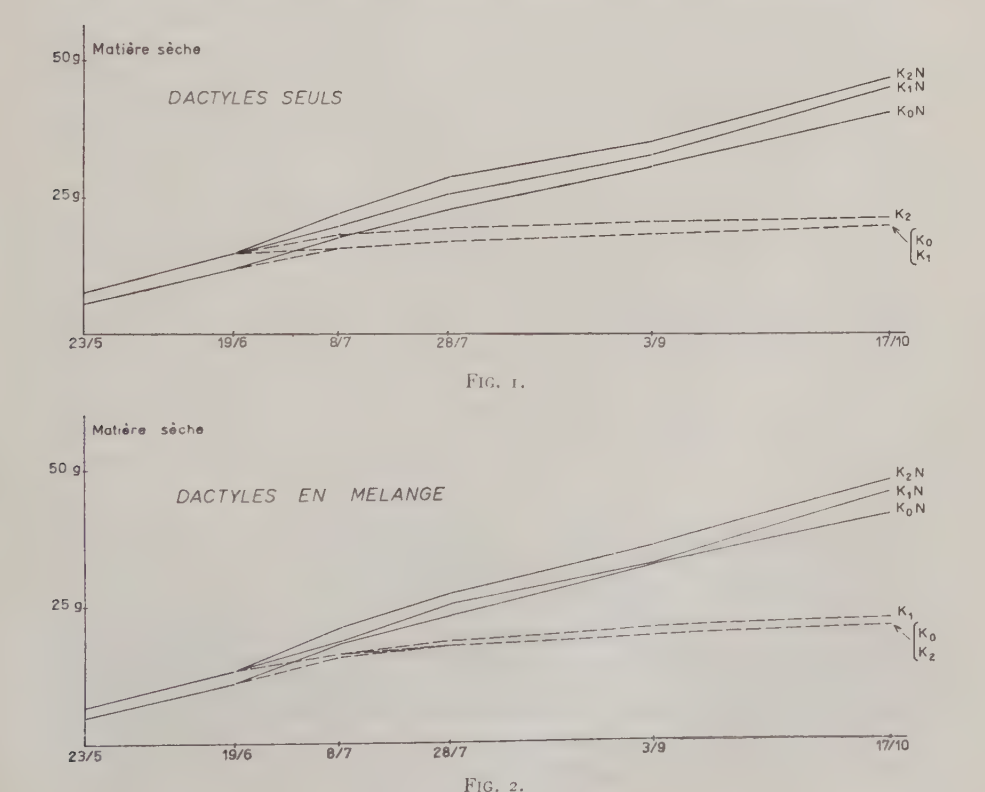


FIG. 1.

FIG. 2.

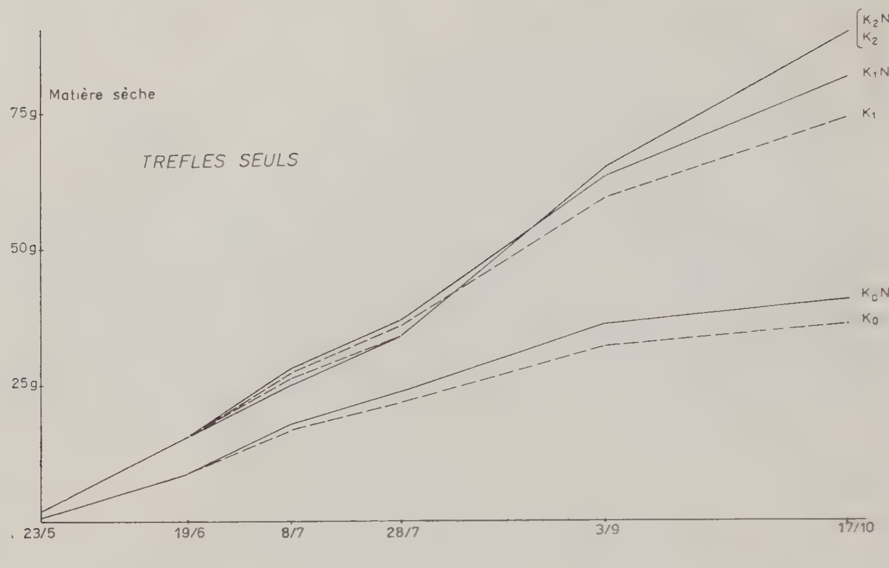


Fig. 3.

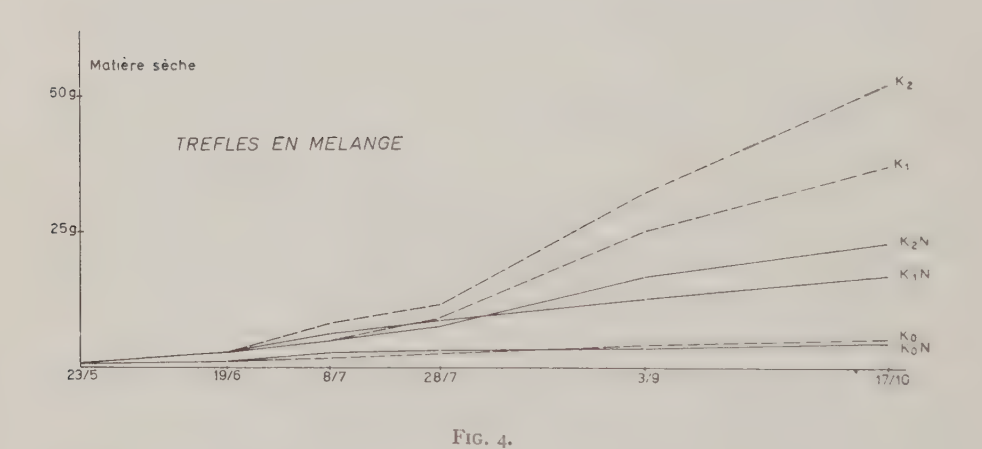


Fig. 4.

a) **Dactyle**

La récolte de dactyle (récolte totale de matière sèche par pot) est la même qu'il soit seul ou mélangé au trèfle blanc.

Évidemment la fertilisation azotée a une action extrêmement efficace sur les rendements. Sans fertilisation azotée, le dactyle ne dispose que de l'azote assimilable provenant de la minéralisation d'une petite fraction de la matière organique de la terre des pots. Cette nitrification se fait rapidement dans les vases de végétation où la terre, relativement bien aérée, s'échauffe rapidement au printemps. On constatera

(tableau I) que cette fourniture, dont la quantité d'azote exportée à chaque prélèvement par le dactyle sans fertilisation azotée nous donne une idée, est surtout importante pendant les deux premiers prélèvements.

Bien que la terre soit pauvre en potassium assimilable, la fertilisation potassique a une action relativement faible sur le rendement du dactyle seul ou en mélange cette première année de culture. Cette faible action ne se manifeste que lorsque la nutrition azotée n'est pas le facteur limitant le rendement.

b) **Trèfle**

La récolte du trèfle poussant en mélange est très inférieure à celle du trèfle poussant seul. Le trèfle est « étouffé » par le dactyle, tout au moins en partie. Cet étouffement est particulièrement net au début de la végétation (lors des deux premiers prélèvements)et lorsque la fertilisation azotée favorise le dactyle au détriment du trèfle. Il faut d'ailleurs souligner que, au début de la végétation, la nutrition azotée est bonne pour toutes les séries de pots, par suite de la forte minéralisation de la matière organique azotée de la terre.

En milieu carencé en potassium la récolte de trèfle est faible dans le cas où il pousse seul, et est minime lorsqu'il croît en mélange avec le dactyle. Quand il y a déficience en potassium, le trèfle est donc particulièrement désavantagé dans le mélange ; et l'on constate en conséquence que la fertilisation potassique augmente proportionnellement nettement plus la récolte du trèfle en mélange que du trèfle seul.

En dehors des résultats déjà connus de l'action des fertilisations azotée et potassique sur la compétition graminée-légumineuse, la conclusion la plus frappante de l'étude des rendements est que, la première année, le dactyle donne le même rendement, qu'il soit seul ou en mélange avec le trèfle blanc ; par contre, le rendement du trèfle blanc est fort diminué par la présence de dactyle ; cette diminution de rendement étant accentuée par tout ce qui favorise la croissance du Dactyle (fertilisation azotée par exemple). C'est le mélange dactyle-trèfle bien fertilisé qui a donné le plus de matière sèche à l'hectare quoique la récolte du trèfle seul n'en soit pas très éloignée.

Si les résultats de cette expérience étaient transposables à la culture au champ (il est vraisemblable que cette transposition ne peut, en particulier se faire, lorsque l'eau est le facteur limitant le rendement) on pourrait dire que : lorsque l'on désire récolter du dactyle rien n'empêche d'y mettre aussi du trèfle qui sera récolté en supplément, tandis que lorsque l'on veut avoir une forte récolte de trèfle, il ne faut pas y mélanger le dactyle.

Tableau I

Azote		Teneurs en % de la m. s. 23/5	19/6	8/7	28/7	3/9	17/10	Quantités exportées (en mg) 23/5	19/6	8/7	28/7	3/9	17/10	Export. totale en g
Dactyles seuls : Sans azote	Ko..	3,8	2,5	2,6	2,2	1,8	1,2	205	160	67	29	22	19	0,50
	K1..	3,2	2,3	3,0	2,2	1,9	1,1	238	160	65	29	17	26	0,54
	K2..	—	—	2,6	2,3	1,8	1,2	—	—	60	35	21	16	0,53
Avec azote	Ko..	—	—	3,7	2,8	2,1	2,9	—	—	236	144	165	283	1,20
	K1..	—	—	3,7	2,6	2,1	2,8	—	—	228	148	158	349	1,28
	K2..	—	—	3,7	2,6	2,3	2,6	—	—	256	157	158	310	1,28
Dactyles en mélange : sans azote	Ko..	3,8	2,6	2,4	2,1	1,8	2,1	191	166	99	39	27	32	0,55
	K1..	3,4	2,4	2,6	2,0	2,3	2,9	228	157	73	50	49	39	0,60
	K2..	—	—	2,6	2,2	2,4	2,8	—	—	71	38	32	25	0,55
avec azote	Ko..	—	—	3,7	2,6	2,1	3,1	—	—	256	128	185	271	1,20
	K1..	—	—	3,6	2,5	2,4	2,9	—	—	260	139	151	420	1,36
	K2..	—	—	3,5	2,5	2,4	2,7	—	—	251	145	204	324	1,31
Trèfles seuls : sans azote	Ko..	4,8	4,7	4,0	4,6	5,1	5,3	46	345	326	251	521	190	1,68
	K1..	4,1	4,6	4,2	4,8	4,3	5,0	75	592	475	377	982	714	3,22
	K2..	—	—	4,0	4,8	4,0	4,7	—	—	479	359	1230	1120	3,85
avec azote	Ko..	—	—	4,4	4,2	4,7	5,4	—	—	425	254	563	228	1,86
	K1..	—	—	4,3	4,5	4,4	4,6	—	—	521	395	1145	811	3,54
	K2..	—	—	4,5	4,3	4,3	4,5	—	—	484	444	1290	1090	3,97
Trèfles en mélange : sans azote	Ko..	4,4	5,1	3,2	5,1	5,5	5,4	23	47	22	36	79	69	0,28
	K1..	4,2	4,1	2,9	4,8	4,0	4,8	36	114	67	184	638	626	1,67
	K2..	—	—	2,8	4,8	3,9	3,8	—	—	93	170	795	776	1,98
avec azote	Ko..	—	—	4,0	5,2	5,2	5,7	—	—	30	31	50	10	0,19
	K1..	—	—	3,5	4,9	4,6	4,8	—	—	93	115	196	191	0,75
	K2..	—	—	3,4	4,6	4,0	4,1	—	—	73	104	364	259	0,95

2° COMPOSITION MINÉRALE ET EXPORTATIONS

A. — Teneurs et exportations en azote

a) Dactyle

Tout d'abord, l'expérience réalisée avec le dactyle poussant seul et sans fertilisation azotée nous montre que la fourniture d'azote par le sol a été forte seulement au début de la végétation ; après le deuxième prélèvement l'exportation d'azote par la partie aérienne prélevée tombe brusquement. La quantité totale exportée étant de l'ordre de 0,5 g d'azote, la quantité fournie était supérieure à cette quantité (représentant 100 kg à l'hectare environ). Les quatre fractions de 0,250g d'azote ajoutés, soit 1 g au total, ne se retrouvent pas, ce qui est normal, dans le supplément d'azote exporté (0,75 g environ). La première année, le bilan de l'azote du sol (N organisé moins N minéralisé) est déficitaire en raison de la forte libération d'azote minéral qui s'est produite au début de l'expérience ; il est probable que les autres années, il ne serait plus déficitaire, mais bénéficiaire ainsi qu'il est connu.

La teneur en azote du dactyle cultivé seul dépend essentiellement de la nutrition azotée. Sans fertilisation azotée sa teneur baisse peu à peu au cours des prélèvements. Avec fertilisation azotée échelonnée, on maintient sa teneur à une valeur convenable tant au point de vue croissance qu'au point de vue valeur alimentaire (pour la nutrition animale).

Le Dactyle en mélange ne se différencie pas du dactyle croissant seul. Toutefois, on constate dans le dernier prélèvement que lorsqu'il n'y a pas fertilisation azotée, le dactyle en mélange est plus riche en azote que celui cultivé seul. On peut donc penser que cet azote supplémentaire provient de la minéralisation de débris racinaires du trèfle, débris riches en azote. Ce faible apport tardif (pour la première année de culture) serait un peu plus fort lorsqu'on apporte une fertilisation potassique, c'est-à-dire lorsque la croissance du trèfle a été relativement bonne.

b) Trèfle

Sous l'influence de l'apport de potassium, le trèfle assimile beaucoup plus d'azote ; mais, comme cela se traduit par une augmentation de rendement, la teneur en azote de la matière sèche varie peu. Toutefois il faut remarquer que, dans les plantes carencées en potassium, la teneur en azote est, lors des derniers prélèvements, plus élevée que celle des plantes non carencées ; ce qui pourrait signifier que la carence en potassium nuit plus à la croissance qu'à l'assimilation de l'azote de l'air par la légumineuse.

Les exportations d'azote suivent donc d'assez près les rendements et l'apport K2 était utile (0,63 g d'azote d'exporté en plus par pot).

Dans les trèfles en mélange, on fait les mêmes constatations : baisse des teneurs en azote des trèfles bien nourris en potassium par rapport à ceux carencés en cet élément ; augmentation (relativement plus importante que pour les trèfles cultivés seuls) des exportations d'azote sous l'influence de la fertilisation potassique, comparable d'ailleurs à l'augmentation relative du rendement.

Il apparaît que la récolte maximum de protéines s'obtient par la culture du trèfle seul (3,8 g d'azote par pot, dont 0,5 g ayant pour origine la matière organique du sol et 3,3 g provenant de l'assimilation de l'azote de l'air). Elle est d'ailleurs considérable.

Il est curieux de constater que la fertilisation azotée du mélange dactyle-trèfle diminue la récolte totale de protéines (2,26 g d'azote au lieu de 2,53 g) lorsque la nutrition potassique est convenable (K2). En fait, toute cause favorisant le trèfle dans la compétition augmente la récolte de protéines (fertilisation potassique, manque de fertilisation azotée).

B. — Teneurs et exportations en potassium

a) Dactyle

La fertilisation potassique agit fortement sur l'absorption du potassium par le dactyle et, puisque le rendement varie peu sous l'influence de cette fertilisation, la teneur en potassium est fortement accrue, surtout celle du dactyle jeune (premiers prélèvements). La fertilisation potassique supplémentaire n'a pas eu d'action sur la teneur en potassium du dactyle.

La fertilisation azotée étant le principal facteur limitant le rendement c'est elle qui a l'action la plus manifeste sur la teneur et les exportations du dactyle.

1° Dans le cas de déficience en potassium elle augmente peu l'absorption ou les exportations, tandis qu'elle accroît fortement le rendement, de sorte qu'elle abaisse considérablement la teneur en potassium.

2° Lorsque l'alimentation potassique est suffisante, la teneur en potassium est rétablie à ce qu'elle était sans fertilisation azotée de sorte que celle-ci augmente considérablement l'absorption et en conséquence l'exportation. Le supplément du potassium (K2 moins K1) a, dans ce cas, une très légère action.

Les exportations de potassium sont doublées sous l'influence de la fertilisation potassique et triplées lorsque la nutrition azotée est convenable. Mais il faut considérer que le cas de carence potassique aussi pronon-

Tableau II

Potasse K_2O		Teneurs en % de la m. s.						Quantités (en mg) exportées.						Export. totale en g
		23/5	19/6	8/7	28/7	3/9	17/10	23/5	19/6	8/7	28/7	3/9	17/10	
Dactyles seuls : sans azote	K0..	1,4	2,2	2,6	2,7	2,4	1,7	77	141	71	36	31	27	0,38
	K1..	3,7	3,8	3,5	3,4	2,5	2,0	336	270	76	46	23	48	0,80
	K2..	—	—	4,0	3,2	2,7	2,3	—	—	90	49	33	29	0,81
avec azote	K0..	—	—	1,7	1,5	0,7	1,1	—	—	108	77	52	105	0,56
	K1..	—	—	3,5	3,2	2,6	2,3	—	—	213	179	192	282	1,47
	K2..	—	—	3,9	3,4	2,7	2,6	—	—	275	208	186	323	1,60
Dactyles en mélange : sans azote	K0..	1,8	2,7	2,2	3,1	2,0	2,6	89	151	89	58	31	19	0,44
	K1..	4,8	3,8	3,3	3,5	2,5	3,4	326	243	95	87	54	45	0,85
	K2..	—	—	3,5	3,7	2,7	3,5	—	—	96	66	35	33	0,80
avec azote	K0..	—	—	1,5	1,4	0,7	1,4	—	—	114	71	64	122	0,61
	K1..	—	—	3,7	3,6	2,9	2,0	—	—	251	214	206	272	1,51
	K2..	—	—	4,0	3,6	2,8	2,4	—	—	285	216	232	285	1,59
Trèfles seuls : sans azote	K0..	0,7	1,0	0,9	1,1	0,8	0,6	7	69	75	49	87	23	0,31
	K1..	3,1	3,3	2,9	1,5	1,8	1,3	58	422	324	134	411	179	1,53
	K2..	—	—	3,0	2,9	2,8	2,2	—	—	352	218	870	524	2,44
avec azote	K0..	—	—	0,9	0,9	0,7	0,7	—	—	87	58	89	33	0,34
	K1..	—	—	2,4	2,3	1,6	1,2	—	—	293	224	390	224	1,61
	K2..	—	—	3,3	3,0	3,2	2,4	—	—	364	307	959	589	2,70
Trèfles en mélange : sans azote	K0..	0,6	0,8	0,8	0,7	0,5	0,6	3	7	5	5	8	15	0,04
	K1..	3,6	2,7	1,6	2,0	1,2	1,4	33	75	38	72	183	160	0,56
	K2..	—	—	2,1	3,2	2,4	1,4	—	—	69	114	485	289	1,05
avec azote	K0..	—	—	0,7	0,6	0,6	0,7	—	—	6	4	5	2	0,03
	K1..	—	—	1,7	1,7	0,6	0,9	—	—	46	40	27	40	0,26
	K2..	—	—	2,4	3,5	2,4	1,7	—	—	52	80	220	105	0,57

cée qu'elle l'est dans l'expérience est un cas anormal en culture intensive, de sorte qu'il faut surtout souligner le peu d'influence d'une fertilisation potassique supplémentaire (doublée) sur la teneur et l'exportation du potassium du dactyle.

On constate de nouveau que le dactyle en mélange se comporte comme s'il était seul au point de vue nutrition potassique.

b) **Trèfle**

Le trèfle est particulièrement sensible à la carence en potassium (symptômes de déficience dans la série K_0) et sa teneur varie considérablement en fonction de la nutrition potassique. Comme l'action sur le rendement est très grande, les exportations du trèfle cultivé seul varient de 1 à 8 fois en atteignant des chiffres très forts (2 g 4 de K_2O par pot ou 480 kg de K_2O à l'hectare par extrapolation). Alors qu'en milieu carencé en potassium le trèfle cultivé seul absorbe moins de potassium que le dactyle, il en absorbe en milieu enrichi presque 2 fois plus qu'un dactyle alimenté convenablement en azote.

On constate aussi très nettement l'influence de l'apport supplémentaire de potassium (apport doublé) sur la teneur du trèfle, alors que le rendement augmente, mais assez peu, sous l'influence de cet apport supplémentaire. En conséquence, les exportations se trouvent considérablement accrues par cet apport supplémentaire.

La fertilisation azotée a peu d'influence sur la teneur en potassium et sur les exportations de la récolte du trèfle cultivé seul.

La présence de dactyle gêne considérablement l'absorption du potassium par le trèfle : en milieu carencé, le trèfle a, alors, une teneur extrêmement faible, minimale ; avec l'apport K1 sa teneur est encore faible et beaucoup moins élevée qu'en l'absence de Dactyle ; avec l'apport K2 sa teneur devient presque normale mais encore inférieure à celle qu'il avait lorsqu'il était seul.

En raison du rôle du potassium sur la compétition dactyle-trèfle, la fertilisation potassique peut faire varier l'exportation de potassium par le trèfle en mélange de 1 à 20 fois environ.

La fertilisation azotée en défavorisant le trèfle dans le mélange abaisse les exportations de potassium par le trèfle, bien qu'ayant peu d'influence sur sa teneur en potassium.

Si l'on compare les cultures normales c'est-à-dire du trèfle sans fertilisation azotée, du dactyle + trèfle avec fertilisation azotée et du Dactyle avec fertilisation azotée, on voit que les exportations de potassium vont en décroissant dans l'ordre indiqué.

TABLEAU III

Magnésie MgO.		Teneurs en % de la m. s.						Quantités exportées (en mg).						Export. totale en g
		23/5	19/6	8/7	28/7	3/9	17/10	23/5	19/6	8/7	28/7	3/9	17/10	
Dactyles seuls : sans azote	Ko..	0,6	0,8	1,0	0,8	0,7	0,9	31	51	28	10	9	15	0,14
	K1..	0,8	0,8	1,0	1,0	0,8	0,8	60	58	22	13	7	20	0,18
	K2..	—	—	1,1	0,8	0,8	0,9	—	—	25	12	9	12	0,18
avec azote	Ko..	—	—	1,0	0,7	0,8	0,8	—	—	63	36	61	85	0,33
	K1..	—	—	1,1	0,8	0,8	0,9	—	—	68	43	60	108	0,40
	K2..	—	—	1,1	0,8	0,9	0,8	—	—	78	50	60	99	0,40
Dactyles en mélange : sans azote	Ko..	0,6	0,8	0,8	0,7	0,7	0,9	30	48	33	13	11	6	0,12
	K1..	0,8	0,8	0,9	0,7	0,8	0,9	56	53	27	17	17	12	0,18
	K2..	—	—	1,0	0,8	1,0	0,9	—	—	27	13	12	9	0,17
avec azote	Ko..	—	—	0,9	0,5	0,7	0,9	—	—	70	25	60	75	0,31
	K1..	—	—	1,0	0,7	0,9	0,9	—	—	70	41	61	116	0,40
	K2..	—	—	1,0	0,7	0,8	0,8	—	—	75	38	60	94	0,38
Trèfles seuls : sans azote	Ko..	1,1	1,2	1,1	1,2	1,1	0,9	11	91	91	60	113	33	0,40
	K1..	1,2	1,1	1,3	1,1	1,4	1,0	22	148	149	98	305	138	0,86
	K2..	—	—	1,3	1,1	1,2	1,2	—	—	151	81	343	280	1,03
avec azote	Ko..	—	—	1,3	1,2	1,2	0,8	—	—	128	73	149	37	0,49
	K1..	—	—	1,3	1,2	1,4	1,2	—	—	156	119	348	209	1,00
	K2..	—	—	1,3	1,1	1,5	1,2	—	—	136	118	451	298	1,17
Trèfles en mélange : sans azote	Ko..	1,1	1,1	1,3	1,1	1,2	0,9	6	10	9	8	17	24	0,07
	K1..	1,4	1,2	1,1	1,1	1,4	1,0	12	35	27	43	220	91	0,43
	K2..	—	—	1,3	1,2	1,5	1,3	—	—	43	45	302	265	0,70
avec azote	Ko..	—	—	1,2	1,0	1,1	1,0	—	—	9	6	10	4	0,05
	K1..	—	—	1,2	1,2	1,2	1,0	—	—	31	28	53	41	0,20
	K2..	—	—	1,2	1,1	1,3	1,3	—	—	27	27	257	86	0,44

C. — Teneurs et exportations en magnésium

a) Dactyle

La fertilisation potassique a peu influencé la teneur du dactyle en magnésium ce que l'on constate en particulier si l'on compare K2 et K1. Lorsqu'il y a carence potassique, le magnésium ne remplace pas le potassium ; au contraire, il y a plutôt baisse de teneur et quoique le rendement n'ait pas baissé, les exportations de magnésium sont alors plus faibles.

La fertilisation azotée (nitrate de chaux apporté au fond du pot) bien qu'augmentant considérablement le rendement du Dactyle, n'abaisse pas sa teneur en magnésium, de sorte que l'absorption du magnésium et par suite l'exportation du magnésium sont considérablement accrus.

Là aussi, le dactyle en mélange se comporte comme s'il était seul.

b) Trèfle

Le trèfle est plus riche que le dactyle en magnésium. Pour le trèfle de même que pour le dactyle, la fertilisation potassique ne change guère la teneur en magnésium, et cet élément ne remplace pas le potassium en cas de carence. Mais, comme la fertilisation potassique a une action très forte sur le rendement, les exportations (ou absorption) de magnésium sont fortement accrues par la fertilisation potassique et on constate même une nette augmentation des exportations de magnésium sous l'action de l'apport supplémentaire de potassium (K2 moins K1).

Pour le trèfle en mélange avec le dactyle, la teneur en magnésium ne subit pas de fluctuations importantes ; de sorte que les exportations suivent les mêmes variations que celles du rendement et dépendent essentiellement de l'influence des fertilisations azotées et potassiques sur les compétitions dactyle-trèfle. La variation des exportations est environ de 1 à 5 en passant de K0 à K1 et de 1 à 2 en passant de K1 à K2, donc variation globale de 1 à 10 environ.

D. — Teneurs et exportations en calcium

Nous constatons tout d'abord une teneur en calcium beaucoup plus grande chez le trèfle que chez le dactyle (10 fois environ) ce qui est bien connu.

a) Dactyle

La teneur en calcium du dactyle a tendance à croître en fin de végétation et si la fertilisation potassique a une influence de faible amplitude sur la teneur en calcium il faut remarquer que l'on aperçoit néanmoins

Tableau IV

Chaux CaO.		Teneurs en % de la m. s.						Quantités (en mg) exportées.						Export. totale en g
		23/5	19/6	8/7	28/7	3/9	17/10	23/5	19/6	8/7	28/7	3/9	17/10	
Dactyles seuls : sans azote	Ko..	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,9	17	17	7	4	6	14	0,07
	K1..	0,2	0,2	0,2	0,3	0,4	0,7	17	14	5	4	4	16	0,06
	K2..	—	—	0,2	0,3	0,4	0,8	—	—	5	4	4	11	0,06
avec azote	Ko..	—	—	0,3	0,2	0,5	0,6	—	—	21	12	42	56	0,16
	K1..	—	—	0,2	0,2	0,3	0,4	—	—	14	13	24	50	0,13
	K2..	—	—	0,2	0,2	0,3	0,4	—	—	17	11	22	43	0,13
Dactyles en mélange : sans azote	Ko..	0,3	0,3	0,2	0,2	0,4	0,8	15	18	10	4	6	5	0,06
	K1..	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3	0,4	18	12	6	5	6	6	0,05
	K2..	—	—	0,2	0,2	0,3	0,4	—	—	6	4	4	4	0,05
avec azote	Ko..	—	—	0,4	0,3	0,5	0,6	—	—	27	13	48	53	0,18
	K1..	—	—	0,2	0,2	0,4	0,5	—	—	14	12	25	70	0,15
	K2..	—	—	0,2	0,2	0,2	0,3	—	—	15	10	17	34	0,11
Trèfles seuls : sans azote	Ko..	2,2	3,1	3,3	2,8	2,7	1,7	21	225	283	140	276	64	1,01
	K1..	2,0	1,6	1,9	2,2	2,7	2,0	38	193	213	189	618	290	1,54
	K2..	—	—	1,9	1,7	2,1	2,4	—	—	224	123	641	560	1,78
avec azote	Ko..	—	—	3,2	2,8	3,1	2,4	—	—	315	168	362	105	1,20
	K1..	—	—	2,3	2,6	3,1	2,8	—	—	284	250	786	497	2,05
	K2..	—	—	1,9	2,1	2,2	2,5	—	—	276	213	639	609	1,97
Trèfles en mélange : sans azote	Ko..	2,0	1,9	2,4	1,8	2,7	1,4	11	18	15	13	36	35	0,13
	K1..	2,1	1,8	1,8	2,0	3,0	2,2	18	52	43	78	476	283	0,95
	K2..	—	—	2,2	2,3	3,2	2,9	—	—	70	83	645	590	1,46
avec azote	Ko..	—	—	2,3	2,1	2,1	1,8	—	—	20	12	22	7	0,09
	K1..	—	—	2,3	2,3	3,8	2,6	—	—	60	55	158	115	0,46
	K2..	—	—	2,1	1,8	3,1	3,1	—	—	45	42	285	187	0,63

un certain antagonisme « teneur en calcium — teneur en potassium » : toutes conditions égales par ailleurs, à une faible teneur en potassium correspond une teneur plus élevée en calcium. Il y a donc tendance à la baisse (de très faible amplitude) des exportations sous l'influence de la fertilisation potassique.

La fertilisation azotée ne faisant pas baisser la teneur en calcium, sauf vraisemblablement en fin de végétation, augmente fortement les exportations en calcium. Le dactyle en mélange se comporte approximativement comme s'il était seul.

b) **Trèfle**

Dans le cas du trèfle cultivé seul on constate plus nettement l'antagonisme potassium-calcium. En fait, ce qui est particulièrement net c'est, en cas de forte déficience potassique, la possibilité de remplacement d'une partie du potassium par du calcium. Car, lorsque l'on passe de K1 à K2, le supplément de potassium qui agit pourtant sur la teneur en potassium du trèfle donne une variation de la teneur en calcium en sens inverse, certes, mais très atténuée.

Pour le trèfle poussant en mélange avec le dactyle, l'influence de la fertilisation potassique sur la compétition dactyle-trèfle est primordiale à tel point que l'antagonisme potassium-calcium disparaît : dans la série K0, alors que le trèfle a une teneur minimale en potassium, la teneur en calcium est peu élevée, nettement moins que lorsque le trèfle est seul ; et l'on constate que la fertilisation potassique K1 augmente à la fois la teneur en potassium et en calcium. En passant de K1 à K2 on peut faire la même constatation lorsqu'il n'y a pas de fertilisation azotée. Mais lorsqu'il y a fertilisation azotée, il y a une légère baisse de la teneur en calcium sous l'influence de l'augmentation très forte de la teneur en potassium (en passant de K1 à K2)ce qui montre encore l'importance de la compétition dactyle-trèfle, sur laquelle la fertilisation azotée influe puissamment.

IV. — DISCUSSION

1° Le dactyle ne souffre pas de la présence du trèfle dans les conditions de l'expérience.

(facteur eau non limitant, répartition régulière et équilibre déterminé entre Trèfle et Dactyle au repiquage...).

Cette constatation permet de dire, tout d'abord, que la photosynthèse nette ayant été la même, qu'il soit seul ou en mélange, la lumière n'était pas le facteur limitant la photosynthèse pour le dactyle. Ceci ne nous étonne guère en raison du port du dactyle.

Au point de vue alimentation minérale, il ne souffre pas non plus de la présence de trèfle. Du point de vue nutrition potassique nous avons constaté que le dactyle était relativement peu exigeant : la quantité nécessaire pour fabriquer le maximum de matière sèche n'est pas très grande, en raison d'ailleurs de ce que ce maximum n'est pas très élevé (par comparaison au trèfle), et la diminution du rendement est relativement faible (quoique nette) lorsque la nutrition potassique est défectueuse. Il a d'autre part une assez grande facilité d'absorption du potassium en milieu pauvre ou peu riche comme on l'a vu.

Du point de vue nutrition azotée, il ne souffre pas non plus de la compétition avec le trèfle. C'est-à-dire que, alors que le trèfle cultivé seul absorbe de l'azote minéral, le dactyle cultivé avec le trèfle absorbe tout l'azote minéral présent, celui provenant de la matière organique du sol et celui de la fertilisation (ou ce qui revient au même : le trèfle « aide » ou fait bénéficier le dactyle d'au moins autant d'azote minéral qu'il en prend lui-même).

La nutrition carbonée, la nutrition azotée, la nutrition potassique n'étant pas troublées par la présence de trèfle il en est de même de la nutrition en autres éléments comme Mg et Ca par exemple, et en définitive de même de la composition minérale.

2° Le trèfle souffre de la présence de dactyle

Puisque le trèfle souffre de la présence de dactyle quelle que soit la fertilisation, il est logique de penser que la lumière est peut-être le facteur limitant le rendement lorsque le dactyle est présent. Ce déficit de nutrition carbonée aurait pour conséquence une diminution d'assimilation d'azote par les bactéries des nodosités, qui sont très sensibles à une déficience de nutrition carbonée de la plante.

Le trèfle est aussi très gêné dans sa nutrition minérale et en particulier dans sa nutrition potassique par la présence de dactyle. La déficience de nutrition carbonée est-elle la cause première? Cela est possible, mais on doit noter que l'absorption de K est plus touchée que le rendement par la présence de dactyle puisque la teneur en K de la matière sèche est diminuée par cette présence. On sait d'ailleurs que la légumineuse de prairie a plus de difficulté que la graminée à absorber du potassium que l'on soit dans un milieu riche ou pauvre en potassium (2). Ceci tient vraisemblablement au fait que les légumineuses ont une absorption préférentielle pour les cations bivalents, ceci étant en corrélation avec une plus grande capacité d'échange des racines des légumineuses par rapport à celles des racines de graminées (3).

3° Les légumineuses, plantes exigeantes en potassium

Nous avons déjà constaté quelques manifestations des exigences du trèfle en potassium : nécessité d'absorber une grande quantité de potassium en raison des grandes possibilités de rendement, difficulté de se nourrir dans un milieu pauvre ou même moyennement riche (nécessité bien connue d'une norme en potassium assimilable du sol nettement supérieure pour une légumineuse que pour une graminée, pour assurer une nutrition suffisante de potassium). Mais comment expliquer que le rendement du trèfle soit beaucoup plus affecté que celui du dactyle par la concentration en potassium de ses tissus? On pourrait penser que ce qui différencie graminée et légumineuse, c'est-à-dire l'assimilation de l'azote de l'air, est particulièrement amoindri par la carence potassique. Nous ne le pensons pas, car la teneur du trèfle en azote n'est pas inférieure dans le cas de carence en potassium et est même supérieure lors des derniers prélèvements. Beaucoup d'autres constatations nous incitent à penser que le potassium est particulièrement nécessaire dans la synthèse protéique. Les légumineuses sont nécessairement génétiquement riches en protéines, et on peut comprendre qu'une bonne concentration en potassium soit nécessaire à la synthèse et au fonctionnement de ces protéines, un mauvais fonctionnement de celles-ci ou de certaines d'entre elles, entraînant par suite une diminution de la photosynthèse nette.

4° La composition minérale

Lorsqu'on étudie les interactions entre diverses alimentations minérales (N, P, K, Ca, Mg...) il est nécessaire de bien poser le problème : étudie-t-on l'influence d'une carence très sévère en cet élément? ou compare-t-on une alimentation optimum du point de vue rendement à une alimentation moins abondante? ou une alimentation excessive à une alimentation optimum?

L'expérience décrite montre bien cette nécessité.

5° Les exportations d'éléments minéraux

Il est évident que lorsque le sol est dans un bon état de richesse en éléments nutritifs, ce sont les exportations qui conditionnent la fertilisation ultérieure (restitutions).

Tout facteur, et tout élément minéral nutritif en particulier, qui influe sur la croissance agit sur l'absorption des autres éléments nutritifs. On a vu cette action de l'azote sur le dactyle ; du potassium sur le trèfle.

Puisque la fertilisation azotée du dactyle augmente l'absorption de potassium, dans une terre normalement pourvue de cet élément, il

va de soi qu'elle entraînera une nécessité de restitution plus abondante de potassium ; d'où le lien appelé parfois « équilibre » entre les fertilisations azotée et potassique.

Il est bon aussi de faire remarquer que, si le dactyle est capable d'absorber assez facilement du potassium en milieu relativement pauvre, cela ne veut pas dire qu'il n'aura pas besoin de fertilisation potassique ultérieurement. En effet, c'est la nécessité de restitution qui conditionne la fertilisation ultérieure. Autrement dit, le dactyle appauvrissant le milieu, pour laisser ce milieu dans le même état (pauvre ou non) qu'à l'origine, il faut restituer des quantités de potassium qui, étant donnée la facilité d'absorption de cet élément par le dactyle, sont assez grandes.

CONCLUSION

Cette expérience en vases de végétation sur la nutrition azotée et potassique de deux espèces de plantes de prairies, cultivées seules ou en mélange, nous a montré qu'une telle expérimentation en vases était précieuse pour essayer de comprendre :

— les différences d'aptitudes d'une graminée (dactyle) et d'une légumineuse (trèfle blanc) vis à vis de l'absorption minérale et, par suite, les exigences différentes de ces plantes ;

— leur comportement différent lorsqu'elles sont en compétition et l'influence de la nutrition minérale (N, K) sur cette compétition ;

— l'interaction de toutes ces influences (espèce végétale, nutrition minérale, compétition) sur la composition minérale des récoltes.

En sachant bien que les résultats d'expériences en vases ne peuvent être transposés tels quels à l'Agriculture, cette meilleure compréhension nous permettra peut-être de raisonner un peu mieux les problèmes agronomiques concernant les prairies.

D'autre part ces résultats se rapportent à la première année de culture, et on conçoit bien qu'il eût été nécessaire de poursuivre cette expérience une autre année qui aurait représenté la phase « stationnaire » par rapport à la phase « d'établissement ».

RÉSUMÉ

Cette expérience effectuée en vases de végétation, a conduit aux résultats suivants :

1º Dans les conditions de l'expérience, le dactyle n'a pas souffert de la présence de trèfle, tandis que le trèfle a son rendement très amoindri par la présence de Dactyle, quelle que soit la nutrition minérale.

2º On constate l'action bien connue de la nutrition azotée du dactyle

et de la nutrition potassique du trèfle sur les rendements respectifs de ces espèces végétales et sur la compétition entre graminée et légumineuse.

3° La fertilisation potassique remédiant à une déficience prononcée en potassium agit fortement sur la teneur en potassium du dactyle tandis qu'un apport supplémentaire de potassium n'a que peu d'influence.

Le trèfle, particulièrement sensible à la déficience en potassium, voit sa teneur et son rendement augmenter fortement ; de sorte que les exportations sont accrues considérablement par la fertilisation potassique ; et l'apport supplémentaire a encore une action manifeste.

La fertilisation azotée étant le principal facteur limitant le rendement du dactyle, augmente considérablement l'absorption du potassium par cette plante, lorsque les disponibilités en cet élément le permettent. Alors que le dactyle se comporte en mélange avec le trèfle comme s'il était seul, le trèfle souffre de la présence du Dactyle au point de vue de son alimentation potassique.

4° La fertilisation potassique influence peu la teneur du dactyle en magnésium. Il en est de même de la fertilisation azotée qui augmente donc considérablement les exportations de magnésium, par suite de l'augmentation de rendement qu'elle procure.

La fertilisation potassique influence peu la teneur en magnésium du trèfle.

5° L'antagonisme potassium-calcium se manifeste faiblement chez le Dactyle, dans cette expérience. Chez le trèfle, il est plus apparent, mais surtout dans le cas de forte déficience en potassium.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) BURGEVIN (H.). — Le rôle de l'expérimentation physiologique dans l'expérimentation agricole. *Ann. Agr.* p. 447-467, 1938.

(2) PARSONS (J. L.), DRAKE (M.) et COLBY (Wm G.). — Yield and vegetative and chemical composition of forage crops as affected by soil treatment. *Soil. Sci. Soc. Amer. Proc.*, **17**, p. 42-46, 1953.

(3) GRAY (B.), DRAKE (M.) & COLBY (Wm. G.). — Potassium competition in Grass-Legume associations as a function of root cation exchange capacity. *Soil. Sci. Soc. Amer. Proc.*, **17**, p. 235-239, 1953.

CHRONIQUE DES LIVRES

GUELFI (J.) — **Initiation mathématique à la physique médicale et à la biologie** . *Paris, Masson et C°*, 1958, 220 p. + VIII.

Ce petit volume, fort bien présenté et imprimé, s'adresse aux étudiants en médecine, aux étudiants du P.C.B., aux biologistes. En fait, il suppose une certaine culture mathématique pour pouvoir le lire avec fruit. C'est un livre extrêmement condensé dont les divers chapitres sont illustrés d'exemples appliqués à la biologie.

Les 6 premiers chapitres consacrés à l'algèbre, à la géométrie et à la trigonométrie sont assez faciles et résument beaucoup de connaissances en peu de place. Les 6 autres chapitres sur le calcul vectoriel, géométrie infinitésimale, séries de FOURIER, équations différentielles, complément de mécanique et calcul des probabilités, présentent une substance beaucoup plus difficile à assimiler. Il faut cependant féliciter l'auteur de la manière très élégante avec laquelle il présente ses divers sujets.

C'est un livre d'initiation pour bons biologistes-mathématiciens susceptible de rappeler rapidement quelques méthodes de calcul. Mais le chapitre de calcul des probabilités est à déconseiller au chercheur qui n'a que de vagues notions sur cette question. Il ne peut être étudié avec fruit qu'après lecture d'ouvrages plus simples.

G. DUCET

DONALDSON (P. E. K.) — **Electronique apparatus for biological research.** *London, Butterworths scientific publications*, 1958, 711 p. XI.

Cet ouvrage comporte quatre parties. La première est consacrée à une étude théorique allant des résistances au « cathode follower » en passant par les tubes électroniques et les divers systèmes d'amplification. Elle est présentée simplement et comporte de nombreuses applications pratiques de calcul numérique et graphique.

La seconde partie pratique donne diverses descriptions de matériaux utilisés. La troisième est consacrée à des mesures particulières : mesure de lumière, de température, d'humidité, de radioactivité ; montage et utilisation de relais, électrodes. La quatrième traite du montage d'appareils en vue de certains essais : amplificateurs utilisés en biologie, méthodes d'enregistrement et détection des pannes et erreurs d'utilisation.

L'ensemble, accompagné d'une bonne bibliographie, donne un ouvrage utile et pratique pour le chercheur qui a besoin d'appareils électroniques.

La présentation est excellente tant pour l'impression, les figures et dessins que la qualité du papier.

G. DUCET

BENEZECH (Chr.) — **Physicochimie biologique et médicale.**
Paris, Masson, 1958, 684 p.

Exposant les principaux phénomènes et les lois fondamentales de la physicochimie utiles à la biologie, cet ouvrage a le grand mérite d'être bien équilibré.

D'une lecture aisée et agréable, aussi complet que possible mais non trop détaillé, clair et succinct, assez rigoureux mais jamais trop abstrait, didactique, pensé et non compilatoire, il offre un auxiliaire précieux à tout biologiste, étudiant ou chercheur, et constitue un outil d'autant plus appréciable que rares sont encore les ponts ainsi jetés entre la biologie et la chimie physique.

La première des quatre parties rappelle les éléments de la thermodynamique, les lois de la cinétique moléculaire et celles de la structure de l'atome. La deuxième traite essentiellement de la chimie physique des solutions. La troisième a pour sujet les systèmes dispersés et s'attarde à juste titre aux protéines qui font l'objet d'un développement plus détaillé.

Plus proprement biologique, la dernière partie est consacrée à quelques grands problèmes : plasma, réactions cellulaires, sources d'énergie des êtres vivants, réactions enzymatiques, échange et transferts, mécanisme de régulation.

J. MOSSÉ

Le Directeur gérant : B. LACLAVIÈRE.

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 4-12-1959

Dépôt légal : 4e trimestre 1959 N° d'impression : 656

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Bâtiment provisoire du Palais de Chaillot, PARIS-XVIe. Tél. : CARnot 08.00.
Directeur : H. FERRU

ADMINISTRATION ET SECRÉTARIAT DE LA RÉDACTION :
Bâtiment provisoire du Palais de Chaillot, PARIS-XVIe. Tél. CARnot 08.00.

TARIF DES ABONNEMENTS POUR 1959

	FRANCE	ÉTRANGER	LE N°
SÉRIE A. — AGRONOMIE	4.000	4.600	800
SÉRIE A *bis.* — PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE	1.500	1.900	500
SÉRIE B. — AMÉLIORATION DES PLANTES	2.600	3.000	800
SÉRIE C. — ÉPIPHYTIES	2.600	3.000	800
SÉRIE C *bis.* — ABEILLE	1.800	2.100	600
SÉRIE D. — ZOOTECHNIE	1.800	2.100	600
SÉRIE E. — TECHNOLOGIE	2.600	3.000	800

Chaque demande de changement d'adresse doit être accompagnée de 40 fr. en timbres-poste.

Les demandes d'abonnements doivent être adressées au Régisseur des Publications de l'Institut National de la Recherche Agronomique, Bâtiment provisoire du Palais de Chaillot, PARIS-XVIe. C. C. P. : PARIS, 9064-43. Elles peuvent être également souscrites par l'intermédiaire de libraires dans les conditions habituelles.

TABLE DES MATIÈRES